

诺卡氏菌对油酸的羟基化作用

柴伟航 李祖义*

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

摘要 诺卡氏菌 (*Nocardia* sp. N13) 休止细胞对油酸 (顺-9-十八碳烯酸) 进行羟基化作用。用休止细胞转化时最适温度为 30℃, 最适 pH 为 6.5, 当菌体 (干菌) 与底物的最适比例为 20:1 时, 对油酸的转化率为 83.4%。不同的表面活性剂影响转化的效果。N13 休止细胞在磷酸缓冲液中重复转化 3 次仍可保持 50% 左右的转化率。红外光谱、质谱、核磁共振鉴定产物为 10-羟基硬脂酸。

关键词 羟基脂肪酸, 油酸, 诺卡氏菌 *Nocardia* sp. N13

利用生物催化可对化合物进行多种修饰^[1]。作为脂类组成成分的脂肪酸, 在体内的代谢过程中, 羟基脂肪酸是重要的中间体。同时, 羟基脂肪酸也是前列腺素、白三烯等具有重要生理活性物质的前体; 另一方面, 羟基脂肪酸也是重要的化工原料^[2,3]。由于微生物酶系繁多, 培养较容易, 寻找可转化脂肪酸的微生物来源已成为一种研究方向^[4]。

可作为底物进行转化的长链脂肪酸种类很多, 但只有利用自然界含量丰富的原料作为底物来用于制备新化合物才是比较经济的。油酸 (顺-9-十八碳烯酸) 是自然界中最普遍的不饱和脂肪酸, 来源广泛易得。早在 1927 年, 就有人用化学法将油酸在酸性条件下水解得到 9-和 10-羟基硬脂酸^[5], 产物可用作润滑剂、表面活性剂、增塑剂, 也可作为去污剂的成分^[6]或用于树脂的合成^[7]。本实验室选择油酸作为底物, 筛选能转化这种脂肪酸的微生物。一株放线菌 (*Nocardia* sp. N13) 的休止细胞对油酸进行转化, 形成 10-羟基硬脂酸, 并研究了转化过程中各种条件的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株: 诺卡氏菌 *Nocardia* sp. N13, 由本组筛选得到, 斜面及液体培养温度 30℃。

1.1.2 培养基: 液体发酵培养基 (%): 蛋白胨 0.5, 酵母粉 0.5, 葡萄糖 2, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.5, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, pH6.8~7.0。斜面培养基: 上述培养基中加入 2% 琼脂, 0.1MPa 30min 灭菌。

1.2 方 法

1.2.1 休止细胞的制备: *Nocardia* sp. N13 在斜面培养基上活化, 挑一环于 50ml 液体发酵培养基中 (250ml 三角瓶), 30℃ 往复摇床 (120r/min) 培养 24h, 按 100ml 加入 0.28g 油酸进行诱导, 继续培养 24h, 600r/min, 4℃ 离心 20min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤。

* 联系人

本文于 1994 年 5 月 18 日收到。

2 次，制成休止细胞。

1.2.2 转化过程：将制得的休止细胞（干菌）悬浮于 pH6.5 0.05mol/L 磷酸缓冲液中至 0.04g/ml 的浓度，加入 20mg 油酸，在 150r/min 旋转摇床上反应 24h，薄板层析（TLC）（展开剂为石油醚：乙醚：乙酸=80：20：1.5）。

1.2.3 产物分析：反应 24h 后，用 6mol/L HCl 将 pH 调至 2 终止反应，等量乙醚提取 2 次，饱和 NaCl 洗涤至中性，无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤，减压除去溶剂，蒸干物经 TLC 定性分析。产物经甲酯化进行 GC 分析，测定转化率⁽⁸⁾。GC 使用毛细管气相色谱仪 Virian 6000，毛细管柱 OV 225，氢焰离子化检测器，离子化温度 280℃，程序升温：起始柱温 170℃，保温 1min，10℃/min 升温至 230℃，保温 15min，载气压力：N₂：0.98MPa，H₂：0.088MPa，气化温度 280℃。

1.3 产物的分离、结构鉴定

将甲酯化产物经硅胶 H 柱层析分离纯化，收集产物部分，测¹HNMR，MS，IR。核磁共振仪：BRUCKER AMX-300，质谱仪：VG QUATTRO MS/GC/MS，红外光谱：KBr 压片，Shimad ZU IR-440。

2 结果与讨论

2.1 N13 菌转化油酸的产物结构鉴定

油酸经 N13 休止细胞转化后，乙醚提取，甲酯化产物用硅胶柱层析分离，干法装柱，以石油醚：乙酸乙酯=200：5 的洗脱液进行洗脱，TLC 检查产物，收集极性大的部分，测 IR、¹HNMR、MS。

IR 在 3200~3400cm⁻¹处有一明显的羟基吸收峰。质谱的分析结果如下：m/z 297 [M + 1-H₂O]，201 [CH₃OOC (CH₂)₈CHOH]、169 [201-CH₂OH]，143 [CH₃(CH₂)₇CHOH]。核磁共振结果如下：δH (ppm) 0.88 (-CHCH₃)，1.61 (-CH-OH)，2.27 2.32 (-COCH₂-)，3.66 (-OCH₃)。

以上图谱数据表明，油酸已被 N13 的休止细胞转化为带有羟基的脂肪酸，MS 的断裂特征显示羟基位置在第 10 位碳原子上。转化后，原来的双键消失，NMR 谱中没有双键 H 的位移。

2.2 各种条件对 N13 休止细胞转化油酸的影响

2.2.1 转化时间的影响：按方法中所示条件转化，不同时间取样，提取产物经甲酯化，GC 测转化率，得图 1，8h 后转化率已达 63%，16h 为 80%，24h 后反应基本完成，转化率最高达 83.4%。

2.2.2 pH 对转化的影响：将等量的休止细胞悬浮于不同 pH 的磷酸缓冲液中，加入 20mg 油酸，转化 24h，用 GC 测转化率，见图 2。转化时最适 pH 为 6.5，在 pH6~7 的范围内转化率都较高，而酸性及碱性环境都不利于转化的进行，这与 Davis 等⁽⁹⁾报道的用 *Pseudomonas* sp. 转化油酸的最适 pH 有所不同，该菌转化最适 pH 为 8.3。

2.2.3 温度对 N13 休止细胞转化的影响：N13 休止细胞在 pH6.5 的磷酸缓冲液中，在不同温度下转化 24h，分析结果见图 3，此菌转化的最适温度为 30~40℃，以 30℃ 时转化率最高。

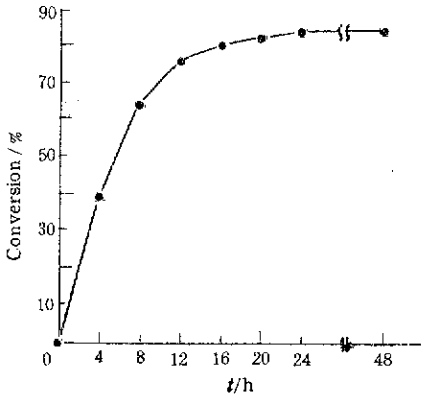


图1 转化时间对N13休止细胞转化油酸的影响

Fig. 1 Time course of the production of HSA by the resting cells of *Nocardia* sp. N13 (HSA: 10-hydroxy stearic acid)

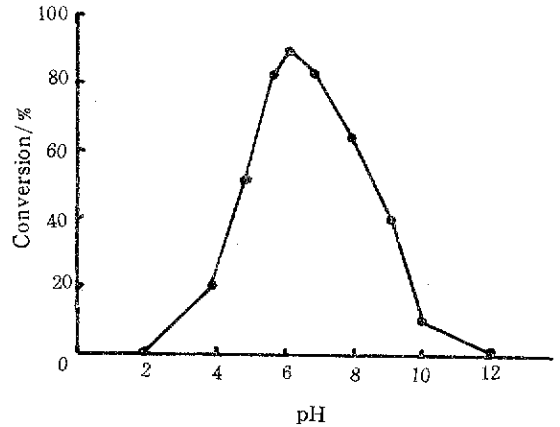


图2 pH对N13转化油酸的影响

Fig. 2 Effect of pH on the production of HSA by the resting cells of *Nocardia* sp. N13

2.2.4 表面活性剂对转化的影响:为了使油酸在磷酸缓冲液中更好地与细胞接触,能有效地进出细胞膜,在反应的缓冲液中加入少量的表面活性剂,促使油酸和水呈乳状液。将1.5g湿菌体加入10ml磷酸缓冲液中,加15mg油酸,按0.3%的比例加入不同的表面活性剂,经24h转化,测定的转化率如表1所示。

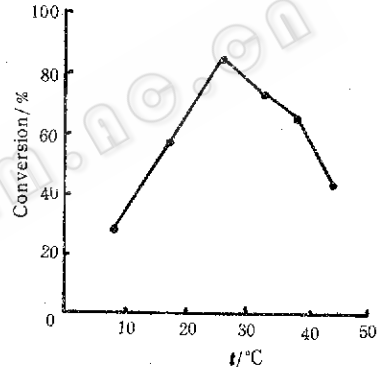


图3 温度对N13休止细胞转化的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the production of HSA by the resting cells of *Nocardia* sp.

表1 表面活性剂对转化油酸的影响

Table 1 Effect of surfactants on the production of HSA

Surfactants	Conversion rate/%
Sodium dodecyl sulfonate	65.2
Sodium dodecylbenzene sulfonate	67.1
Tween-85	50.3
Span-85	58.0
Triton X-100	89.7
Control	87.3

从表1看出,不同表面活性剂对反应的影响不同,除 Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)的添加可以略微增加一些转化率外,加入其它种类表面活性剂反而降低转化率,这可能是表面活性剂对休止细胞或转化酶系有一定的伤害。在不加任何表面活性剂的对照实验中,经过摇床振荡后,观察到反应液逐渐成为乳状液,形成均一分散体系,看不出

双相体系的存在。由于油酸分子中含有自由羟基, 具有亲水性, 因此, 在不加表面活性剂的情况下也能达到较好的转化效果。

2.2.5 氧对转化反应的影响: 将新鲜培养的 N13 菌体用生理盐水充分洗涤干净后, 除去菌体表面的培养基成分, 然后悬浮于生理盐水中, 振荡 4h, 使菌体内的营养物质消耗掉, 加入油酸, 然后通入 N_2 , 充分排除体系内的空气, 瓶盖密封后, 振荡 24h, 经提取分析, 测到转化率为 83.1%。因此, 该转化反应在没有通气, 反应仍可进行, 且转化率并未下降很多(通气情况下, 转化率为 86.9%)。生物体中在分子上引入羟基有二个机制, 羟基的来源不外乎水和 O_2 两种分子:



大多数非极性化合物(如饱和烃等)转化为羟基化合物主要是通过(1)的途径, 这一过程不仅需要 O_2 的存在, 而且需要 NADH、NADPH、细胞色素 P450 等一系列酶系来完成^[3]。而本实验在消除了外界与菌体内的 O_2 影响, 细胞仍可对油酸进行羟基转化, 因此推测 N13 对油酸的羟基化可能是属于(2)的, 即水进攻油酸分子中的双键, 形成羟化产物, 这类似于有机反应中的加成反应。前面产物结构证实了羟基是在第 10 位碳原子上形成的。这种情况与 Wallen 等^[10~12]报道油酸羟化的结果相似, 他们用同位素实验显示 D_2O 中的一个 D 进入油酸分子中。

2.2.6 休止细胞的重复性转化: N13 休止细胞转化油酸后, 上清液用等量乙醚提取, 分析转化率。离心所得菌体用磷酸缓冲液离心洗涤两次, 重新悬浮于上述磷酸缓冲液中, 再加入油酸, 同样条件再进行转化, 24h 后测转化率。如此重复操作, 每次测定休止细胞对油酸的转化率, 结果如图 4。转化次数越多, 休止细胞对油酸的转化率越低。每一次转化后, 休止细胞的转化率大约要下降 10%~20%, 在重复 3 次时, 转化率仍可达 53.2%, 但单纯用休止细胞进行重复转化并不能达到理想的效果, 现正在研究用固定化细胞进行重复转化。

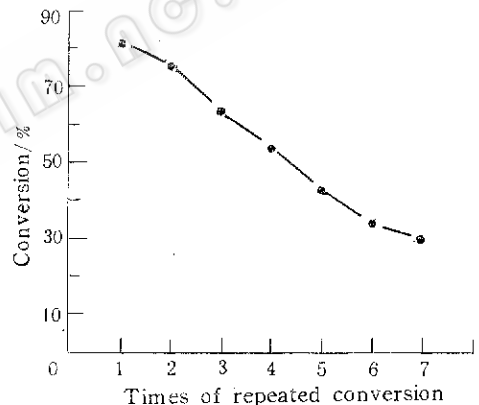


图 4 N13 的休止细胞转化油酸的重复性
Fig. 4 Repeated use of the resting cells of *Nocardia* sp. N13 for the conversion of oleic acid

参 考 文 献

- [1] 李祖义, 宋明华. 生物工程学报, 1990, 6 (4): 259~264.
- [2] Tomecho C G, Adams R. J Am Chem Soc, 1927, 49: 530~532.
- [3] Liekenjie M S F, Lam C H. Chem Phys Lipids, 1978, 20~25.
- [4] Rosazza J P. Microbial Transformation of Bioactive Compounds, CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. 1982.
- [5] Tomecko C G, Adams R. J Am Chem Soc, 1927, 49: 532.
- [6] Soda K. J Am Oil Chem Soc, 1987, 64: 1254.
- [7] Litchfield J H, Pierce G E. U. S. Patent, 1986, 4, 582, 304.
- [8] Holut B J, Skeaff C N. Meth Enzymol, 1987, 141: 234.

- [9] Davis E N, Wallen L L, Goodwin J C *et al.* *Lipids*, 1969, **4**: 356~362.
[10] Wallen L L, Benedict R D C, Jackson R W. *Arch Biochem Biophys* 1962, **99**: 249.
[11] Schroepfer G J, Bloch R, *J Biol Chem*, 1965, **240**: 54.
[12] Niehaue W G, Kistic J A A, Torkelson *et al.* *J Biol Chem*, 1970, **245**: 3790~3797.

Hydroxylation of Oleic Acid by *Nocardia* sp.

Chai Weihang Li Zuyi

(*Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai 200032*)

Abstract The resting cells of *Nocardia* sp. N13 were used to hydroxylate oleic acid (cis-9-octadecenoic acid). *Nocardia* sp. N13 gave a good yield with optimum conditions at pH6.5 and 30°C after shaking 24 hours. Yields of 83.4% could be obtained when the optimum ratio of dry weight of resting cells to substrate was 20 : 1. The product was determined as 10-hydroxystearic acid by ¹HNMR, IR and MS. Surfactants could affect the conversion differently. The conversion of about 50% can be obtained after three times of repeatation.

Key words Hydroxy fatty acids, oleic acid, *Nocardia* sp.