



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107418923 B

(45)授权公告日 2018.03.23

(21)申请号 201710857192.1

(22)申请日 2017.09.20

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107418923 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(83)生物保藏信息  
CGMCC NO. 14464 2017.07.26

(73)专利权人 华东理工大学  
地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号  
专利权人 江苏奥赛康药业股份有限公司

(72)发明人 郁惠蕾 赵骞 张龔 潘江  
许建和

(74)专利代理机构 北京东方灵盾知识产权代理  
有限公司 11506  
代理人 苏向银

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12P 17/16(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(56)对比文件

CN 103114109 A,2016.05.22,全文.

CN 105695425 A,2016.06.22,全文.

CN 101372676 A,2009.02.25,全文.

Peter Babiak et al..Whole-cell  
oxidation of omeprazole sulfide to  
enantiopure esomeprazole with  
Lysinibacillus sp. B71.《Bioresource  
Technology》.2011,第102卷7621-7626.

审查员 孙琳

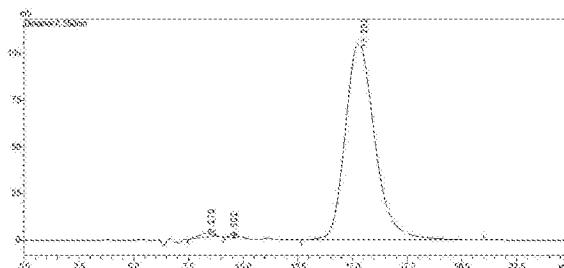
权利要求书2页 说明书10页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

伯克霍尔德菌及其应用

(57)摘要

本发明公开了一株伯克霍尔德菌,所述伯克霍尔德菌为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)ECU0712,保藏号为CGMCC NO.14464。以该菌株或其提取物作为生物催化剂,催化硫醚不对称氧化成手性亚砜,具有显著的优势,所得产物光学纯度高,且具有反应体系简单、催化剂制备时间短和产物得率高等优点。



1. 格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*), 其特征在于所述格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 为格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) ECU0712, 保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为CGMCC No.14464。

2. 权利要求1所述的格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 的提取物, 其特征在于所述提取物为无细胞提取液、或无细胞提取液的冻干品; 所述无细胞提取液是将格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 通过破碎、分离获得。

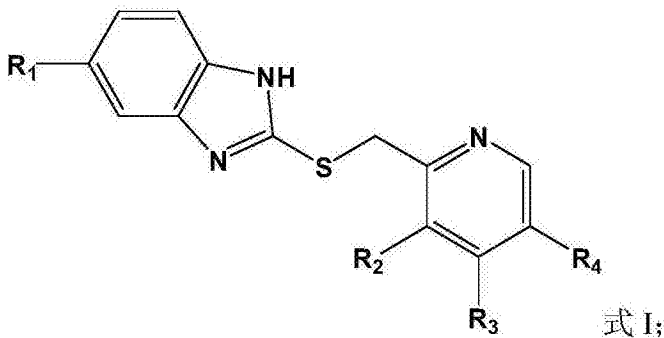
3. 根据权利要求2所述的格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 的提取物, 其特征在于所述提取物进行了固定化。

4. 格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 或其提取物作为催化剂催化硫醚不对称氧化成手性亚砷的用途; 其特征在于所述格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 为保藏号CGMCC NO.14464的格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*); 所述提取物为无细胞提取液、或无细胞提取液的冻干品; 所述无细胞提取液是将格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 细胞通过破碎、分离获得。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其特征在于所述提取物进行了固定化。

6. 根据权利要求5所述的用途, 其特征在于所述提取物以戊二醛作为交联剂, 固定化于聚乙烯亚胺。

7. 根据权利要求4~6中任一项所述的用途, 其特征在于所述硫醚选自以下化合物或其药学上可接受的盐:

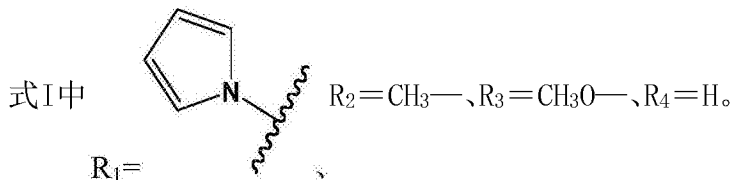


化合物OME, 式I中 $R_1 = \text{CH}_3\text{O}-$ 、 $R_2 = \text{CH}_3-$ 、 $R_3 = \text{CH}_3\text{O}-$ 、 $R_4 = \text{CH}_3-$ ;

化合物LAN, 式I中 $R_1 = \text{H}$ 、 $R_2 = \text{CH}_3-$ 、 $R_3 = \text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $R_4 = \text{H}$ ;

化合物PAN, 式I中 $R_1 = \text{F}_2\text{CHO}-$ 、 $R_2 = \text{CH}_3\text{O}-$ 、 $R_3 = \text{CH}_3\text{O}-$ 、 $R_4 = \text{H}$ ;

化合物RAB, 式I中 $R_1 = \text{H}$ 、 $R_2 = \text{CH}_3-$ 、 $R_3 = \text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $R_4 = \text{H}$ ; 化合物ILA,



8. 根据权利要求7所述的用途, 其特征在于:

当硫醚为化合物OME或其药学上可接受的盐时, 手性亚砷为5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚磺酰基)-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐;

当硫醚为化合物PAN或其药学上可接受的盐时, 手性亚砷为5-二氟甲氧基-2-[[ (S) - (3,4-二甲氧基-2-吡啶基) -甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐;

当硫醚为化合物ILA或其药学上可接受的盐时,手性亚砷为5-(1H-吡咯-1-基)-2-[ (R)-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶基)-甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐。

9. 根据权利要求4~6中任一项所述的用途,其特征在于所述催化硫醚不对称氧化的方法为:将格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 或其提取物,与硫醚共同加入反应体系中。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中包括下述一个或多个特征:

(a) 所述反应在pH为7.5-9.0的缓冲溶液中进行;

(b) 所述反应的温度为15-35℃;

(c) 所述反应的时间为4-48小时;

(d) 所述硫醚在反应体系中浓度为1-100g/L;

(e) 所述硫醚溶解于助溶剂中,所述助溶剂为水溶性有机溶剂,所述助溶剂占反应体系的2~15%的体积。

11. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述缓冲溶液pH为8.0-9.0。

12. 根据权利要求11所述的用途,其特征在于所述缓冲溶液pH为8.5-9.0。

13. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述缓冲溶液选自磷酸钠缓冲液、Tris-HCl缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸钾缓冲溶液中的一种。

14. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于所述缓冲溶液为磷酸钾缓冲溶液。

15. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述反应的温度为20-35℃。

16. 根据权利要求15所述的用途,其特征在于所述反应的温度为20-30℃。

17. 根据权利要求15所述的用途,其特征在于所述反应的温度为25-30℃。

18. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述反应的时间为5-48小时。

19. 根据权利要求18所述的用途,其特征在于所述反应的时间为6-48小时。

20. 根据权利要求18所述的用途,其特征在于所述反应的时间为7-48小时。

21. 根据权利要求18所述的用途,其特征在于所述反应的时间为8-48小时。

22. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述硫醚在反应体系中浓度为1-20g/L。

23. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述助溶剂占反应体系的5~10%的体积。

24. 根据权利要求10所述的用途,其特征在于所述助溶剂选自乙腈、叔丁醇、四氢呋喃、乙醇、异丙醇、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷、甲醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种。

25. 根据权利要求24所述的用途,其特征在于所述助溶剂选自乙醇、异丙醇、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷、甲醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种。

26. 根据权利要求24所述的用途,其特征在于所述助溶剂选自二甲基亚砷、甲醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种。

## 伯克霍尔德菌及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一株伯克霍尔德菌及其应用于硫醚不对称氧化合成手性亚砷的方法。

### 背景技术

[0002] 5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑钠,可以用于治疗十二指肠溃疡、胃溃疡、胃炎以及消化道食管炎。化学法利用金属和有机小分子催化剂不对称氧化硫醚来合成,已取得重大的进展,但这类方法存在过度氧化、副产物多、分离提纯工艺复杂等缺点。

[0003] 使用生物法来对硫醚化合物进行不对称氧化,得到单一对映体的手性亚砷,这种方法环境污染小,副产物少,原子经济性好,而且产物光学纯度高,因此利用生物法不对称氧化合成手性亚砷受到了越来越多的关注。

[0004] 美国专利US5840552公开了利用微生物选择性氧化潜手性硫醚制备5-甲氧基-2-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑单一对映体的方法,但活性极低,产物浓度在ppm级别;且公开的青霉菌*Penicillin frequentans*、匍茎根霉菌*Rhizopus stolonifer*、玉蜀黍黑粉菌*Ustilago maydis*、嗜石油节杆菌*Arthrobacter petroleophagus*、短杆菌*Breyibacterium paraffinolyticum*、分支杆菌*Mycobacterium sp.*、不动杆菌*Acinetobacter sp.*催化硫醚氧化全部生成5-甲氧基-2-((R)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑,而非所需要的5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑。发明人也曾筛选获得一株红球菌(CGMCC NO.2547)可催化一系列潜手性苯烷基硫醚及其衍生物的不对称氧化,获得了光学活性的手性苯甲亚砷及其衍生物(CN101372676A)。捷克科学家筛选获得了一株短小芽孢杆菌*Lysinibacillus sp.*,利用其生长细胞可催化硫醚生成5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑,但底物浓度为0.1g/L时,44h转化率仅为43%(*Bioresources Technology* 2011,102:7621-7626)。专利CN106191193A公开了一种利用固定化黑曲霉不对称氧化制备5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑的方法,但其细胞培养时间超过72h,且细胞加入量大,繁杂的固定化过程也增加了催化剂的制备成本。

[0005] 为了克服现有技术的局限,本发明重新设计了筛选策略,从土壤这一天然宝库中筛选新的微生物菌株,这为未来的工业应用提供新的生物催化剂资源。

### 发明内容

[0006] 本发明在不同特性的土壤中广泛采集土样,使用不同梯度浓度的硫醚底物进行培养,对土壤中的菌株进行富集和驯化培养,筛选获得了一批能够催化硫醚不对称氧化的细菌。

[0007] 本发明第一方面,公开了一株伯克霍尔德菌,命名为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712。2017年7月26日该菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理

委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC NO.14464。

[0008] 本发明格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712具有如下形态特征:革兰氏阴性菌、无孢子形成、杆状、宽0.6-0.9 $\mu\text{m}$ ,长1.1-1.4 $\mu\text{m}$ 。菌落为圆形、白色、潮湿、半透明、边缘规则。

[0009] 生物分类就是遵循分类学原理和方法,对生物的各种类群进行命名和等级划分。一般使用界、门、纲、目、科、属、种加以分类;种是最基本的分类单位。在生物学中,常用双名法命名为生物命名;即每个物种名字有两部分构成,属名和种加词(种名);在科学文献的印刷出版时,一般使用斜体表示。

[0010] 具体菌株的命名可以采用属名+种名+菌株代号的方式,例如*Burkholderia glathei* ECU0712。*Burkholderia*表示属名,*glathei*表示种名,ECU0712表示菌株代号。*Burkholderia*可译为伯克氏菌属,又译伯克霍尔德菌,*glathei*可译为格氏。伯克氏菌属已经发现的物种不少于38个,其中最常见的是*Burkholderia cepacia*(洋葱伯克霍尔德菌)。

[0011] 本发明所公开的格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712可以是各种具有生命活力的状态,例如可以为生长细胞状态、静息细胞状态、或冻干细胞状态。静息细胞又称休止细胞,其处于休眠状态,不进行生长繁殖,在适宜条件下可再恢复生长。

[0012] 示例性的,将所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712进行培养,培养混合物离心后可以获得静息细胞。通过离心获得获得静息细胞对于本领域技术人员是常规的方法;例如所述离心转速8000-10000rpm,时间为15-30min。

[0013] 示例性的,将所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712静息细胞,采用本领域常规的冷冻干燥技术(例如实验室常规的-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻;真空度0.1-0.2mbar,温度-50 $^{\circ}\text{C}$ --80 $^{\circ}\text{C}$ ,冷冻干燥24-48h)可以获得所述*Burkholderia glathei* ECU0712冻干细胞。所述冻干细胞可以储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0014] 本发明还公开了格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)的培养方法;所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)优选地为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712。可以通过摇瓶培养、发酵罐培养等常规培养方法进行发酵培养。示例性的发酵培养基组成为:2.0-10.0g/L蛋白胨,2.0-10.0g/L酵母膏,2.0-10.0g/L氯化钠,pH 5.0-8.0。

[0015] 本发明第二方面,公开了格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)的提取物。所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)优选地为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712。

[0016] 本发明公开的格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)的提取物,包括无细胞提取液、或无细胞提取液的冻干品。所述无细胞提取液是将细胞的通过破碎、分离获得;常见的分离手段包括但不限于离心。示例性的,将细胞悬浮于缓冲液中,过滤、破碎(包括但不限于超声破碎、800-1000bar高压破碎)、离心收集上清液即得无细胞提取液;离心转速可以为14000-18000rpm,时间可以为20-30min。

[0017] 将无细胞提取液冷冻干燥可获得无细胞提取液的冻干品。示例性的,将无细胞提取液预冻(例如用实验室常规的-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱),采用常规冷冻干燥技术(例如真空度0.1-0.2mbar,温度-50 $^{\circ}\text{C}$ --80 $^{\circ}\text{C}$ ,冷冻干燥24-48h),即可获得无细胞提取液的冻干品。所述无细

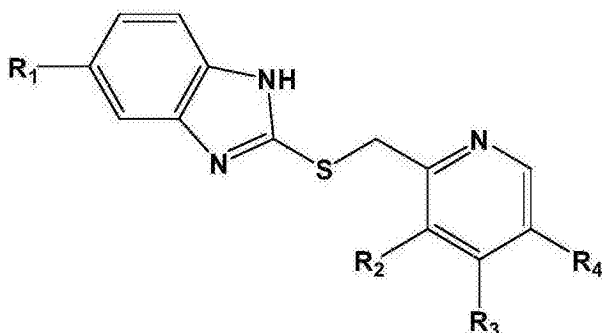
胞提取液的冻干品可储存于4℃备用。

[0018] 本领域技术人员能够知晓,本发明所述的无细胞提取液、或无细胞提取液的冻干品中包括种类繁多的蛋白类物质,及其他物质。其中能够实现催化硫醚底物不对称氧化为手性亚砜功能的蛋白类物质(一般为酶),其种类是无法确定,其含量一般是微量的;也无法通过简单的劳动予以确定、测定。

[0019] 本发明所述的格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)的提取物可以进一步予以固定化。通过固定化,所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)的提取物可以反复、连续使用。本发明所述的催化反应一般是在水溶液中进行的(可以含有一定量的有机溶剂),而固定化则是将所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)的提取物用物理或化学方法处理,使之成为不溶于水的,但仍具有催化活性的状态。示例性的,将无细胞提取液(例如其冻干品),用戊二醛作为交联剂,通过化学方法进行固定化于聚乙烯亚胺(PEI)。

[0020] 本发明第三方面,公开了格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)或其提取物催化硫醚不对称氧化成手性亚砜的用途;所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)优选地为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712。

[0021] 硫醚是一类具有通式 $R_A-S-R_B$ 的化合物;其中 $R_A$ 、 $R_B$ 可以相同也可以不同。从产业化应用角度出发,本发明中的硫醚优选自以下化合物或其药学上可接受的盐:



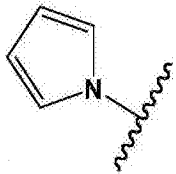
式 I

[0023] 化合物OME,式I中 $R_1=CH_3O-$ 、 $R_2=CH_3-$ 、 $R_3=CH_3O-$ 、 $R_4=CH_3-$ ;

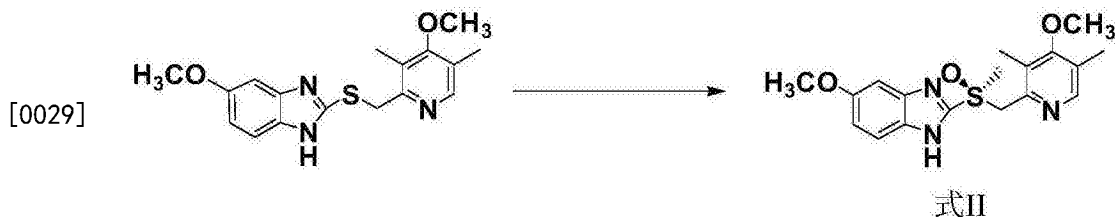
[0024] 化合物LAN,式I中 $R_1=H$ 、 $R_2=CH_3-$ 、 $R_3=CF_3CH_2O-$ 、 $R_4=H$ ;

[0025] 化合物PAN,式I中 $R_1=F_2CHO-$ 、 $R_2=CH_3O-$ 、 $R_3=CH_3O-$ 、 $R_4=H$ ;

[0026] 化合物RAB,式I中 $R_1=H$ 、 $R_2=CH_3-$ 、 $R_3=CH_3-O-CH_2-CH_2-CH_2O-$ 、 $R_4=H$ ;

[0027] 化合物ILA,式I中 $R_1=$    $R_2=CH_3-$ 、 $R_3=CH_3O-$ 、 $R_4=H$ 。

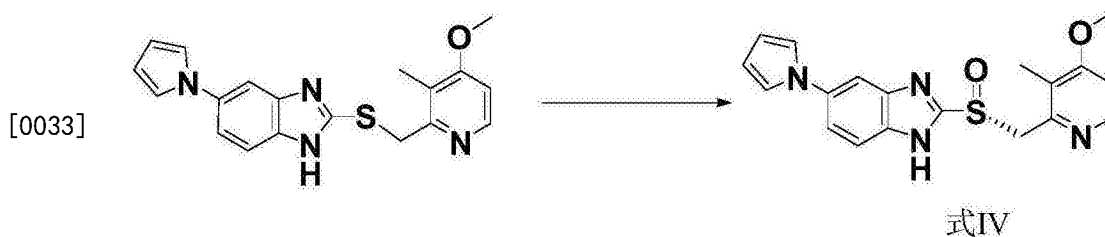
[0028] 当硫醚为化合物OME或其药学上可接受的盐时,硫醚不对称氧化获得的手性亚砜为5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐;如式II所示。



[0030] 当硫醚为化合物PAN或其药学上可接受的盐时,硫醚不对称氧化获得的手性亚砜为5-二氟甲氧基-2-[[ (S) - (3,4-二甲氧基-2-吡啶基) -甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐;如式III所示。



[0032] 当硫醚为化合物IIA或其药学上可接受的盐时,硫醚不对称氧化获得的手性亚砜为5-(1H-吡咯-1-基)-2-[(R) - [(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶基) -甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐;如式IV所示。



[0034] 本发明第四方面,公开了格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 或其提取物催化硫醚不对称氧化成手性亚砜的方法;所述格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 优选地为格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) ECU0712。

[0035] 所述方法为将格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) 或其提取物、与硫醚共同加入适宜反应体系中,即可反应目标产物。

[0036] 所述反应在缓冲溶液中进行。对于缓冲溶液的pH,优选地为pH=7.5-9.0,进一步优选地为pH=8.0-9.0,更进一步优选地为pH=8.5-9.0。对于缓冲溶液的组成,优选地选自磷酸钠缓冲液、Tris-HCl缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸钾缓冲溶液;进一步优选地为磷酸钾缓冲溶液;

[0037] 所述反应的温度优选地为15-35℃,进一步优选地为20-35℃,更进一步优选地为20-30℃,再更进一步优选地为25-30℃。

[0038] 所述反应的时间优选地为4-48小时,进一步优选地为5-48小时;更进一步优选地为6-48小时;再更进一步优选地为7-48小时;再次再更进一步优选地为8-48小时。较长的反应时间从技术角度是可行的,从产业化角度会选择更经济的反应时间长度,因此反应的时间还可以优选地为8-16小时。

[0039] 所述硫醚在反应体系中浓度优选地为1-100g/L,进一步优选地为1-20g/L。

[0040] 所述硫醚优选地溶解于助溶剂中,所述助溶剂为水溶性有机溶剂。所述助溶剂优选地选自乙腈、叔丁醇、四氢呋喃、乙醇、异丙醇、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜、甲醇、丙酮、

二甲基甲酰胺中的一种或多种;进一步优选地选自乙醇、异丙醇、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砜、甲醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种;更进一步优选地选自二甲基亚砜、甲醇、丙酮、二甲基甲酰胺中的一种或多种。

[0041] 优选地所述助溶剂占反应体系的2~15%的体积,进一步优选地所述助溶剂占反应体系的5~10%的体积。

[0042] 对于反应获得的产物,可以在反应结束后用二氯甲烷、乙酸乙酯等溶剂萃取后离心,取有机相,蒸出有机溶剂,得到产物。

[0043] 对于硫醚不对称氧化的底物、产物、副产物的示例性定性、定量分析方法可以如本发明实施例7所公开的。

[0044] 当硫醚为化合物OME或其药学上可接受的盐时,硫醚不对称氧化获得的手性亚砜为5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑或其药学上可接受的盐。示例性的研究表明,产物5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑的得率大于90%,ee值大于99%,副产物砜比例低于0.1%。

[0045] 本发明所公开的格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)或其提取物,优选地为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712或其提取物,在催化硫醚不对称氧化成手性亚砜方面,具有显著的优势,产物得率高、产物光学纯度高(大于99%)、副产物含量低;并且具有反应体系简单、催化剂制备时间短等优点。

## 附图说明

[0046] 图1:实施例1筛选获得的可以不对称氧化化合物OME的菌株的种属的进化树;其中 *Lysinibacillus* sp. 为现有技术报导的可以不对称氧化化合物OME的菌株;图中底部划线的菌株表示不对称氧化的产物为5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑。

[0047] 图2:固定化后的格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712的提取物催化化合物OME氧化反应的进程曲线。

[0048] 图3:实施例12获得的产物的液相色谱谱图。

## 具体实施方式

[0049] 实施例1菌株的筛选

[0050] (1) 采集不同环境土样252份,包括上海奉贤化工区、新华医院、果园、河道附近、绿化带、校园、居民区绿化、上海植物园等。筛选的过程采取了四轮富集培养,初始贫乏培养基配方为酵母粉2g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  6.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0g/L, NaCl 0.5g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.05g/L, pH 7.0, 每一轮传代富集培养中酵母粉的浓度减半,而底物(化合物OME)浓度(首轮浓度0.1mM)在每一轮培养过程中翻倍,筛选得到能够利用底物当作碳源并且将底物转化的目标菌种。培养1-2天后,选择培养液较为浑浊,菌体生长良好的土样试管,从中吸取500 $\mu\text{L}$ 菌液,加入4mL的新鲜贫乏培养基,开始下一轮富集。完成四轮富集培养之后,用薄层色谱进行分析,将底物有明显减少的样品进行平板划线分离,挑取单菌落。



[0051] (2) 将单菌落接种到10ml丰富培养基(葡萄糖1.5g/L,蛋白胨0.5g/L,酵母粉0.5g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05g/L,  $\text{NaCl}$  1.0g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.05g/L)中,30℃培养24h后离心收菌,加入1mL磷酸钾缓冲液(100mM, pH 9.0),加入底物(化合物OME, DMSO助溶,终浓度1.0mM)进行反应。反应24h后停止反应,加入700 $\mu\text{L}$ 的乙酸乙酯进行萃取,萃取液经干燥后用高效液相色谱进行转化率(方法见实施7)的测定,选取转化率大于1%的菌株进行复筛。

[0052] (3) 将单菌落接种到100ml上述丰富培养基中,30℃培养24h后离心收菌,加入5mL磷酸钾缓冲液(KPB, pH 9.0),加入底物(化合物OME, DMSO助溶,终浓度1.0mM)进行反应。反应24h后停止反应,取样1ml加入700 $\mu\text{L}$ 的乙酸乙酯进行萃取,萃取液经干燥后用手性柱分析产物的光学纯度。

[0053] (4) 通过反复比较,筛选获得了一批能够氧化化合物OME的细菌,包括7株菌可氧化化合物OME产生5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑,10株菌可氧化硫醚产生5-甲氧基-2-((R)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑。根据16S rDNA绘制了这些微生物种属的进化树,如附图1,发现我们筛选获得的格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*)与文献报道的短小芽孢杆菌*Lysinibacillus* sp.存在较大差异。这些微生物催化氧化化合物OME的产物的光学纯度结果如表1。

[0054] 表1. 化合物OME氧化菌株的筛选结果

	<i>Strain</i>	<i>ee (%)</i>
	<i>Gordonia neofelifaecis</i>	99.9 (R)
	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i>	99.9 (R)
	<i>Aeromicrobium marium</i>	99.9 (R)
	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	90.6 (R)
	<i>Gordonia amarae</i>	90.3 (R)
	<i>Rhodococcus</i> sp. ECU0066	80.2 (R)
	<i>Gordonia sihwensis</i>	79.5 (R)
	<i>Saccharothrix espanaensis</i>	70.5 (R)
[0055]	<i>Acinetobacter</i> sp.	67.4 (R)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	66.6 (R)
	<i>Burkholderia glathei</i>	99.1 (S)
	<i>Pseudomonas putida</i>	87.2 (S)
	<i>Gordonia terrae</i>	86.8 (S)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	85.1 (S)
	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	83.4 (S)
	<i>Starkeya novella</i>	81.8 (S)
	<i>Fluviicola taffensis</i>	76.1 (S)

[0056] 实施例2格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712的鉴定

[0057] (1) 采用常规方法提取菌株的基因组DNA,以所述菌株的基因组DNA为模板,使用16S rDNA扩增通用引物进行PCR扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,扩增出大约1400bp大小的目的片段,将PCR产物用凝胶纯化试剂盒(北京天根生化公司的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒)进

行纯化回收,最后将回收的DNA片段测序,测序结果如SEQ ID No.1所示。

[0058] (2) 将16S rDNA序列在NCBI数据库中进行比对,我们获得的菌株与格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*,又名*Caballeronia glathei*)的16S rDNA相似性为99%,因此我们将获得的菌株命名为格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712。

[0059] (3) 本发明所述格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712具有如下形态特征:革兰氏阴性菌、无孢子形成、杆状、宽0.6-0.9 $\mu\text{m}$ ,长1.1-1.4 $\mu\text{m}$ 。菌落为圆形、白色、潮湿、半透明、边缘规则。

[0060] 实施例3格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712的摇瓶培养

[0061] 取4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的菌种斜面,接种到试管LB发酵培养基(蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,氯化钠10g/L,pH 7.2)中,30 $^{\circ}\text{C}$ ,200rpm振荡培养10h,形成种子液。将2ml种子液以2%比例接种到100ml发酵培养基(5g/L蛋白胨,5.0g/L酵母膏,5.0g/L氯化钠,pH 6.5)中30 $^{\circ}\text{C}$ 培养24h。离心、洗涤得到静息细胞。

[0062] 实施例4格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712的发酵罐培养

[0063] 取4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的菌种斜面,接种到试管LB发酵培养基(蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,氯化钠10g/L,pH 7.2)中,30 $^{\circ}\text{C}$ ,200rpm振荡培养10h,形成种子液。将300ml种子液接种到装有3L发酵培养基(10.0g/L蛋白胨,5.0g/L酵母膏,8.0g/L氯化钠,pH7.0)的5L发酵罐中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养18h后离心、洗涤得到静息细胞,用于制备反应。

[0064] 实施例5格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712冻干细胞的制备

[0065] 将实施4制备获得的细胞先放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻过夜,在真空度0.1-0.2mbar,冷冻温度-65 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下冷冻干燥24h,即得冻干细胞,可储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0066] 实施例6格氏伯克霍尔德菌(*Burkholderia glathei*) ECU0712无细胞提取液和无细胞提取液的冻干品的制备

[0067] 将实施4制备获得的细胞用1L磷酸钾缓冲液(10mM,pH 7.0)重新悬浮,悬浮液通过100目的滤网过滤,压力为1000bar,连续破碎二次,破碎液离心速度为15000rpm,离心时间为30min,收集破碎上清液即得无细胞提取液。

[0068] 将破碎上清液放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻过夜,在真空度0.1-0.2mbar,冷冻温度-65 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下冷冻干燥48h,即得无细胞提取液的冻干品,可储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0069] 实施例7底物、产物、副产物的定性和定量分析

[0070] (1) 选用硅胶薄板层析法作为检测有无产物生成的定性分析方法,将带有萃取样品的毛细管点于GF硅胶板上,置于展开瓶中,展开剂组成为乙酸乙酯体积:石油醚体积=10:1,待溶剂前沿距板顶端1cm时取出,使用吹风机加速溶剂的挥发,溶剂挥发完成后,在紫外分析仪下观察并与标准样品进行对比。底物(化合物OME)的 $R_f=0.1$ ,产物5-甲氧基-2-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑的 $R_f=0.42$ 。

[0071] (2) 反相高效液相色谱法测定反应转化率:底物(化合物OME)转化为产物5-甲氧基-2-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基)甲基)亚硫酰基)-1H-苯并咪唑的转化率通过使用水相色谱HPLC进行检测,并且对该底物和产物进行定量分析。选用C<sub>18</sub>反相柱(伊利特Hypersil BDS C<sub>18</sub>,5 $\mu\text{m}$ ,4.6mm $\times$ 250mm),流动相为乙腈体积:水体积=53:47,流速1ml $\cdot$ min<sup>-1</sup>,柱温30 $^{\circ}\text{C}$ ,进样量10 $\mu\text{l}$ ,检测波长250nm,产物和底物的保留时间分别为3.9min(R构型与S构型混合物)和5.7min。

[0072] (3) 正相高效液相色谱法测定产物光学纯度和副产物比例: 选用AS-H柱进行产物光学纯度分析, 流动相为正己烷体积: 异丙醇体积 = 30:70, 流速0.5ml/min, 柱温30℃, 进样量10 $\mu$ l, 检测波长250nm, 底物、R-构型亚砷、S-构型产物、和副产物砷的保留时间分别为约8.3min, 12.2min、15.3min和9.3min。

[0073] 实施例8化合物OME氧化反应pH优化

[0074] 1ml反应体系中加入底物(化合物OME) 1g/L(以DMSO助溶, 10% v/v; 表示反应体系中底物浓度为1g/L, 底物用反应体系10%体积的DMSO助溶后加入反应体系), 如实施例3所述的静息细胞1g/L, 葡萄糖1g/L, 以磷酸钾缓冲液(50mM, pH 7.5、8.0、8.5或9.0)控制反应pH, 20℃反应8h后取样分析反应转化率, 如表2所示。

[0075] 表2. 化合物OME氧化反应pH的优化

序号	反应pH	转化率(%)
1	7.5	78
[0076] 2	8.0	88
3	8.5	100
4	9.0	96

[0077] 实施例9化合物OME氧化反应温度优化

[0078] 1ml反应体系中加入底物(化合物OME) 2g/L(以丙酮助溶, 5% v/v), 如实施例3所述的静息细胞1g/L, 葡萄糖1g/L, 以磷酸钾缓冲液(50mM, pH8.5)控制反应pH, 不同温度反应12h后取样分析反应转化率和副产物比例, 如表3所示。

[0079] 表3. 化合物OME氧化反应温度的优化

序号	反应温度	转化率(%)	副产物比例(%)
1	15	45	0
[0080] 2	20	70	0
3	25	>99	0.1
4	30	>99	1.1
5	35	>99	8.5

[0081] 实施例10化合物OME氧化反应助溶剂的优化

[0082] 10ml反应体系中加入底物(化合物OME) 5g/L(以不同助溶剂助溶, 5% v/v), 如实施例6所述的冻干酶粉2g/L, 葡萄糖5g/L, NADP<sup>+</sup>0.2mM, 以磷酸钾缓冲液(50mM, pH 8.5)控制反应pH, 25℃反应12h后取样分析反应转化率, 如表4所示。其中: “+”代表转化率1-10%, “++”代表转化率10.1-30%, “+++”代表转化率30.1-60%, “++++”代表转化率60.1-100%。

[0083] 表4. 化合物OME氧化反应助溶剂的优化

序号	助溶剂	反应转化率
1	空白	+
2	二甲基亚砒	++++
3	甲醇	++++
4	乙醇	+++
5	乙腈	++
[0084] 6	丙酮	++++
7	叔丁醇	++
8	异丙醇	+++
9	二甲基甲酰胺	++++
10	四氢呋喃	++
11	<i>N</i> -甲基吡咯烷酮	+++

[0085] 实施例11格氏伯克霍尔德菌 (*Burkholderia glathei*) ECU0712提取物的固定化和催化反应

[0086] 采用交联酶聚集体的方法对实施例6所制备的无细胞提取液的冻干品进行了固定化。选用聚乙烯亚胺 (PEI) 是较好的酶沉淀试剂, PEI与无细胞提取液的冻干品的最佳质量比为2:1;选择戊二醛作为聚集体沉淀的交联剂,最适浓度为0.2% (w/v)。制备的聚集体悬浮液抽滤,获得的滤饼用KPB (100mM, pH 7.0) 反复洗涤,洗去残余戊二醛,获得的固定化格氏伯克霍尔德菌提取物用于化合物OME的氧化反应。100ml反应体系中加入底物(化合物OME) 10g/L (以DSMO助溶, 5% v/v), 固定化格氏伯克霍尔德菌提取物5g/L, 葡萄糖5g/L, NADP<sup>+</sup> 0.2mM, 以磷酸钾缓冲液 (50mM, pH 8.5) 控制反应pH, 25℃反应不同时间取样检测反应进程, 如图2所示, 反应4小时反应转化率可大于90%, 反应5小时反应转化率可大于95%, 反应8h反应转化率可大于99%。

[0087] 实施例12 5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基) 甲基) 亚硫酰基)-1H-苯并咪唑的制备

[0088] 1L反应体系中加入底物(化合物OME) 20g/L (以DSMO助溶, 10% v/v), 实施例5所制备的冻干细胞15g/L, 葡萄糖10g/L, NADP<sup>+</sup> 0.2mM, 以磷酸钾缓冲液 (50mM, pH 8.5) 控制反应pH, 25℃反应16h。反应结束后用二氯甲烷萃取后离心, 取有机相, 蒸出二氯甲烷, 得到产物5-甲氧基-2-((S)-((4-甲氧基-3,5-二甲基-2-吡啶基) 甲基) 亚硫酰基)-1H-苯并咪唑 19.36g, 收率92.32%, 产物ee值大于99%, 副产物砒比例低于0.1%, 液相色谱图如图3所示。

[0089] 实施例13化合物PAN的氧化

[0090] 1L反应体系中加入底物(化合物PAN) 5g/L (以DSMO助溶, 10% v/v), 实施例5所制备的冻干细胞15g/L, 葡萄糖10g/L, NADP<sup>+</sup> 0.2mM, 以磷酸钾缓冲液 (50mM, pH 8.5) 控制反应pH, 25℃反应10h。反应结束后用二氯甲烷萃取后离心, 取有机相, 蒸出二氯甲烷, 得到产物

4.53g,收率86.78%,产物ee值大于99%。所述产物为5-二氟甲氧基-2-[[ (S)-(3,4-二甲氧基-2-吡啶基)-甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑。

[0091] 实施例14化合物ILA的氧化

[0092] 1L反应体系中加入底物(化合物ILA) 5g/L(以DSMO助溶,10%v/v),实施例5所制备的冻干细胞15g/L,葡萄糖10g/L,NADP<sup>+</sup>0.2mM,以磷酸钾缓冲液(50mM,pH 8.5)控制反应pH,25℃反应10h。反应结束后用二氯甲烷萃取后离心,取有机相,蒸出二氯甲烷,得到产物2.33g,收率44.64%,产物ee值大于99%。所述产物为5-(1H-吡咯-1-基)-2-[(R)-[(4-甲氧基-3-甲基-2-吡啶基)-甲基]亚磺酰基]-1H-苯并咪唑。

## 序列表

<110> 华东理工大学  
江苏奥赛康药业股份有限公司

<120> 伯克霍尔德菌及其应用

<130> 170538I

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1422

<212> DNA

<213> *Burkholderia glathei* CGMCC14464

<400> 1

[0001]

```

tggctcagat tgaacgctgg cggcatgcct tacacatgca agtcgaacgg cagcacgggg      60
gcatecctgg iggcgagtgg cgaacgggtg agtaatacat cggaacgtgt cctgtagtgg      120
gggatagccg gcgaaagccg gattaatacc gcatacgate tacggaagaa agcgggggat      180
cttcggacct cgcgctatag gggcggccga tggcagatta gctagtgggt ggggtaaagg      240
ectaccaagg cgacgatctg tagctgggtc gagaggacga ceagccacac tgggactgag      300
acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt ttggacaatg ggggaaacc      360
tgatccagca atgcccgtg tgtgaagaag gccttcgggt tgtaaagcac ttttgtccgg      420
aaagaaaact tcggggctaa tacctctgga ggatgacgg accggaagaa taagcaccgg      480
ctaactacgt gccagcagcc geggtaatac gtaggggtcgc agcgtaate ggaattactg      540
ggcgtaaagc gtgcccagcc ggtctgttaa gacagatgtg aatccccgg gcttaacctg      600
ggaactgcat ttgtgactag caggctagag tatggcagag ggggtagaa ttccacgtgt      660
agcagtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa taccgatggc gaagcagcc ccctgggcca      720
atactgacgc tcatgcacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtec      780
acgccctaaa cgatgtcaac tagttgttgg ggattcattt ccttagtaac gtacgtaacg      840
egtgaagttg accgctggg gagtacggtc gcaagattaa aactcaaagg aatgacggg      900
gaccegcaca agcggtgat gatgtggatt aatcgatgc aacgcgaaaa accttaccta      960
cccttgacat ggtcggaaacc ctggtgagag ctgggggtgc tcgaaagaga accgacacac     1020
aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga     1080
gcgcaaccct tgtecttagt tcgtacgtaa gagcactcta aggagactgc cggtgacaaa     1140
ccggaggaag gtgggatga cgtcaagtc tcatggccct tatggtagg gcttcacacg     1200
tcatacaatg gteggaacag agggtegcta agcccgagg tggagccaat ccagaaaac     1260
cgatcgtagt ccggatcgta gtctgcacct cgactacgtg aagctggaat cgtagtaat     1320
cgcggatcag catcccggc tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac     1380
catgggagtg ggttttacea gaagtggcta gtctaaccgc aa                       1422

```

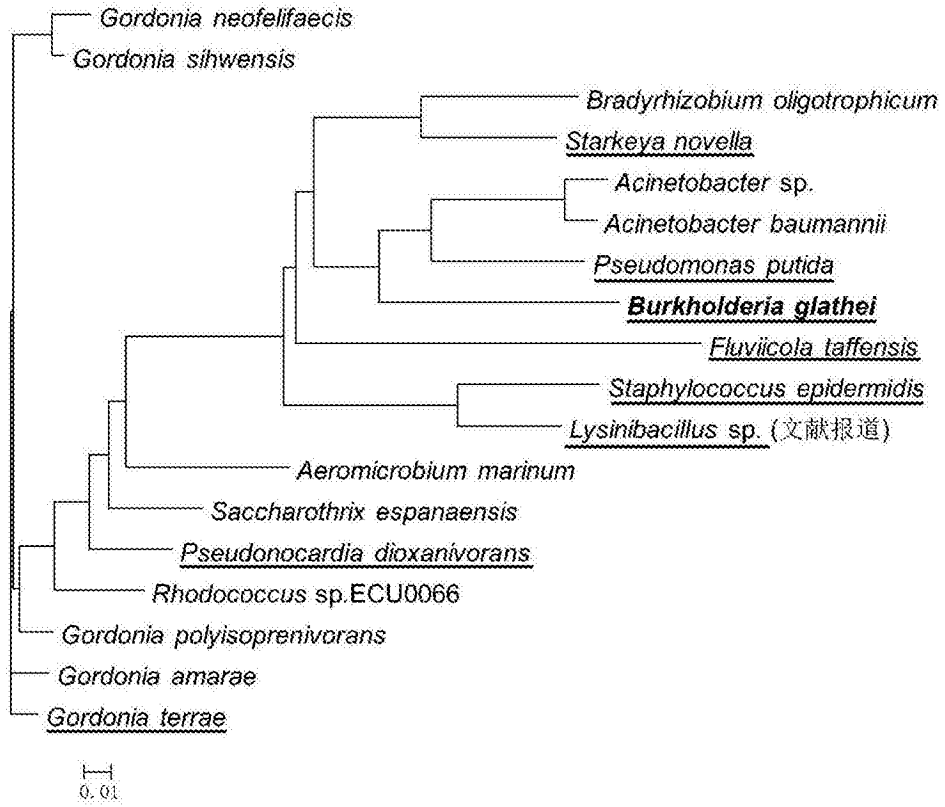


图1

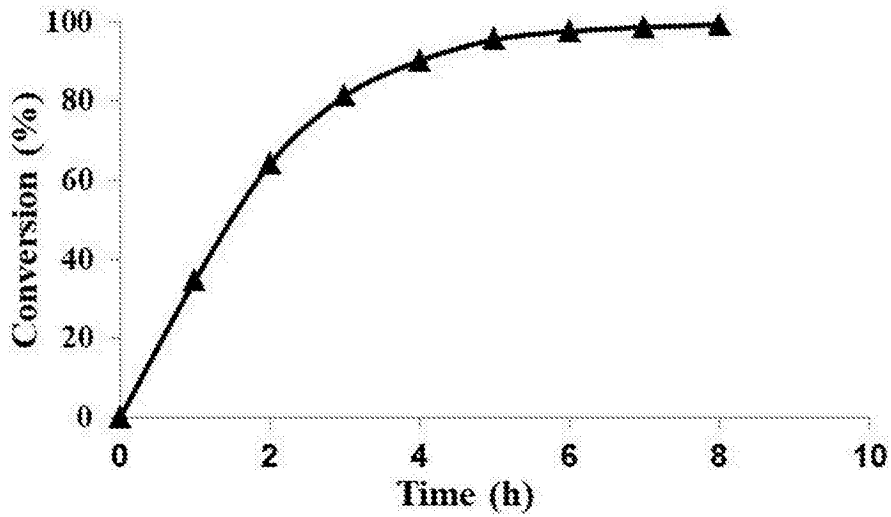


图2

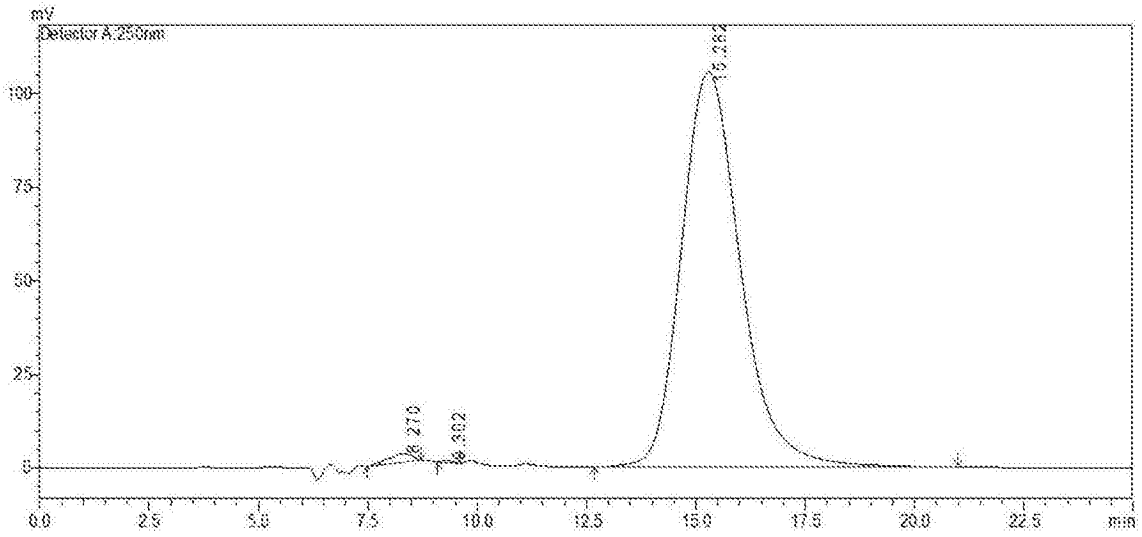


图3