DOI:10.12441/spyswjs.20220317002 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0012-11

环己酮单加氧酶的基因挖掘及高效催化合成奥美拉唑的研究

张 睿[1,2] 席志文[1,2] 张荣珍[1,2*] 徐 岩[1,2]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业微生物教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】为了提高奥美拉唑的合成效率。【方法】以来源于 *Acinetobacter johnsonii*(*A. johnsonii*)的 $CHMO_{NCIMB\ 9871}$ 和来源于 *Priestia megaterium*(*P. megaterium*)的 P450 BM3 为模板,筛选出转化效率最高的单加氧酶并确定其蛋白质诱导的最适条件,通过单因素试验和响应面优化确定该重组酶催化合成奥美拉唑的最优条件。【结果】来源于 *Pseudomonas* sp. 的环己酮单加氧酶 $CHMO_{KT2440}$ 转化效率最高,其蛋白质诱导的最适条件为:菌体 OD_{600} 值 0.6,诱导温度 17 ℃,IPTG 终浓度 0.15 mmol/L。单因素试验结果为:在 33 ℃、pH 9.0、FAD 添加量 0.05 mmol/L、底物质量浓度 3.0 g/L、反应时间 10 h 的条件下,奥美拉唑的产率为 78.9%。$CHMO_{KT2440}$ 催化合成奥美拉唑的回归方程为:y=60.78+9.56A−19.74B+9.55C+1.80AB+5.13AC+1.48BC−18.04A^2−0.79B^2−9.41C^2。结合单因素试验结果,确定最优转化条件为:底物质量浓度 3.0 g/L,反应温度 34 ℃,反应 pH 9.0,FAD 添加量 0.05 mmol/L,反应时间 10 h,在此条件下奥美拉唑的产率高达 79.9%,较优化前提高了 90.23%。【结论】筛选的环己酮单加氧酶 $CHMO_{KT2440}$ 为奥美拉唑的合成提供了一个优秀候选酶。

关键词:环己酮单加氧酶;同源酶挖掘;奥美拉唑;响应面优化;产率

Gene Mining of Cyclohexanone Monooxygenase and Efficient Catalytic Synthesis of Omeprazole

ZHANG Rui[1,2] *XI Zhiwen*[1,2] *ZHANG Rongzhen*[1,2*] *XU Yan*[1,2]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of the study is to synthesize omeprazole efficiently. [**Method**] With $CHMO_{NCIMB\ 9871}$ from *Acinetobacter johnsonii*(*A. johnsonii*)and P450 BM3 from *Priestia megaterium*(*P. megaterium*) as templates, the monooxygenase with the highest transformation rate was screened out and the optimal conditions for inducing protein expression were determined. Single factor experiments and response surface methodology were employed to optimize the conditions of this recombinant enzyme for producing omeprazole. [**Result**] The cyclohexanone monooxygenase $CHMO_{KT2440}$ from *Pseudomonas* sp. synthesized omeprazole with the highest transformation rate. The optimal inducing conditions of $CHMO_{KT2440}$ expression were as follows: OD_{600} value of 0.6, induction temperature of 17 ℃, and final IPTG concentration of 0.15 mmol/L. The single factor experiment results showed that the reaction with 0.05 mmol/L FAD, 3.0 g/L substrate mass concentration at 33 ℃ and pH 9.0 for 10 h produced omeprazole with a yield of 78.9%. The $CHMO_{KT2440}$-catalyzed synthesis of omeprazole was fitted by the

基金项目:国家“十四五”重点研发计划(2023YFA0914500);国家自然科学基金面上项目(32271487);国家轻工业技术与工程一级学科计划(LITE2018-12);高校学科引进人才计划(111-2-06)。

通信作者:张荣珍(1973—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事生物催化和酶工程研究。E-mail:rzzhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-03-17 **修回日期:**2022-04-01

regression equation: y=60.78+9.56A−19.74B+9.55C+1.80AB+5.13AC+1.48BC−18.04A^2−0.79B^2−9.41C^2. Based on the single factor experimental results, the transformation conditions were finally optimized as follows: the substrate mass concentration of 3.0 g/L, 34 ℃, pH 9.0, 0.05 mmol/L FAD, and reaction time of 10 h. Under these conditions, the yield of omeprazole reached 79.9%, which increased by 90.23% compared with that before optimization. [**Conclusion**] This study provides an elite cyclohexanone monooxygenase candidate $CHMO_{KT2440}$ for omeprazole synthesis.

Keywords: cyclohexanone monooxygenase; homologous enzyme mining; omeprazole; response surface optimization; yield

目前，消化性溃疡人群发病率高达10%[1]。用于治疗消化性溃疡的抑酸剂药物主要包括质子泵抑制剂和H_2受体拮抗剂，其中质子泵抑制剂因选择性高、副作用小等优点备受关注[2]。奥美拉唑作为第一代质子泵抑制剂，具有起效快、药效显著的特点，是当前治疗消化性溃疡的主要药物[3]。目前奥美拉唑的生产主要是化学合成法，即奥美拉唑硫脒的不对称氧化法，这一过程需要大量的金属钛和酒石酸二乙酯[4]，存在操作烦琐、产率低的问题。如马金焕等[5]采用二乙酸碘苯构建氧化体系合成奥美拉唑，不仅需要大量的二氯甲烷，且后续纯化操作复杂，最终产率仅为30%。相比之下，生物合成奥美拉唑具有反应收率高、产物手性选择性好、无需重金属手性配体的优点，具有广阔的发展前景。但目前生物合成法存在产率低、光学纯度低的问题。如Yoshida等[6]筛选得到一株能够转化奥美拉唑的真菌 *Cunninghamella echinulata* MK40，但其产率仅为49%。来源于 *Aspergillus flavus* 的$CHMO_{AFL210}$能够转化硫脒底物，但其产物大多为无手性砜[7]。

Baeyer-Villiger单加氧酶是一种黄素依赖型酶，其催化的底物谱较宽。据报道，来源于不动杆菌属的环己酮单加氧酶能够催化烷基芳基硫脒合成亚砜产物，产物的空间选择性高，手性纯度高达61.8%[8]。Walsh等[9]从 *Acinetobacter* sp. 中获得一种环己酮单加氧酶，该酶能催化手性硫化物，并合成产物(S)-对甲苯基亚砜，其光学纯度为64%。除了Baeyer-Villiger单加氧酶外，铁血红素依赖的色素细胞P450单加氧酶也能催化硫脒的不对称氧化。P450酶可以催化多种反应，包括碳原子的羟化、亚砜反应、环氧化和芳香烃的羟化等，因此在生物法制备芳香类化合物中应用广泛[10-11]。Zhang等[12]筛选出了一株来自 *Rhodococcus* sp. 的硫脒单加氧酶$P450_{SMO}$，能够催化奥美拉唑硫脒合成奥美拉唑，产率达68%。

作者以来源于 *A. johnsonii* 的$CHMO_{NCIMB\ 9871}$和来源于 *P. megaterium* 的P450 BM3为模板，利用氨基酸序列比对方法初步筛选出12种候选酶，最终确定采用来自 *Pseudomonas* sp. 的$CHMO_{KT2440}$来催化底物奥美拉唑硫脒合成奥美拉唑。另外，对重组酶的表达条件进行优化，通过单因素试验并选取3个因素进行响应面优化，结合回归方程与单因素试验结果，确定$CHMO_{KT2440}$催化合成奥美拉唑的最佳条件。该研究筛选获得的环己酮单加氧酶$CHMO_{KT2440}$为奥美拉唑的合成提供了一个优秀的候选酶，也为后续工业高效制备亚砜化合物奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌株和质粒

本研究所用到的菌株和质粒如表1所示。

1.1.2　试剂和仪器

DL2000 DNA Marker、Premixed Protein Marker (Low)：TaKaRa生物有限公司；蛋白胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；硫酸卡那霉素、IPTG、FAD、还原型三磷酸吡啶核苷酸四钠盐(NADPH)：北京索莱宝科技有限公司；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、盐酸、氨水、氯化钠、二甲基亚砜、异丙醇、乙腈、甲醇、EDTA：中国医药(集团)上海化学试剂公司。

恒温恒湿培养箱：BXS400-SI型，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；高速冷冻离心机：ST-16R型，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；立式圆形压力蒸汽灭菌器：LS-B50L型，上海医用核子仪器厂；全自动分析仪：Y15型，上海佰三思生物科技有限公司；高效液相色谱仪：1260 Infinity II

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

	菌株/质粒	描述	来源
菌株	*E. coli* DH5α	用于基因克隆的宿主	作者所在实验室
	E. coli BL21	用于基因表达的宿主	作者所在实验室
	E. coli BL21/$CHMO_{NCIMB\ 9871}$	携带 pET28-$CHMO_{NCIMB\ 9871}$ 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*Rh*CHMO	携带 pET28-*Rh*CHMO 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*An*CHMO	携带 pET28-*An*CHMO 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*Ad*CHMO	携带 pET28-*Ad*CHMO 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/4A9W	携带 pET28-4A9W 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/4O4P	携带 pET28-4O4P 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*pm*P450 BM3	携带 pET28-*pm*P450 BM3 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*Sc*P450 BM3	携带 pET28-*Sc*P450 BM3 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*Bs*P450 BM3	携带 pET28-*Bs*P450 BM3 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/$CHMO_{KT2440}$	携带 pET28-$CHMO_{KT2440}$ 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/*Sm*KT2440-2	携带 pET28-*Sm*KT2440-2 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
	E. coli BL21/MLKT2440-3	携带 pET28-MLKT2440-3 质粒的 *E. coli* BL21	本研究
质粒	pET-28a(+)	用于基因表达的质粒	作者所在实验室
	pET28-$CHMO_{NCIMB\ 9871}$	含有 $CHMO_{NCIMB\ 9871}$ 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*Rh*CHMO	含有 *Rh*CHMO 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*An*CHMO	含有 *An*CHMO 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*Ad*CHMO	含有 *Ad*CHMO 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-4A9W	含有 4A9W 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-4O4P	含有 4O4P 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*pm*P450 BM3	含有 *pm*P450 BM3 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*Sc*P450 BM3	含有 *Sc*P450 BM3 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*Bs*P450 BM3	含有 *Bs*P450 BM3 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-$CHMO_{KT2440}$	含有 $CHMO_{KT2440}$ 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-*Sm*KT2440-2	含有 *Sm*KT2440-2 的 pET-28a 质粒	本研究
	pET28-MLKT2440-3	含有 MLKT2440-3 的 pET-28a 质粒	本研究

型，美国安捷伦有限公司。

1.2 目的基因获取

来自 *A. johnsonii* NCIMB 9871 的 $CHMO_{NCIMB\ 9871}$ 催化硫醚不对称亚砜化反应的报道较多[13-19]；此外，来自 *P. megaterium* 的 P450 BM3 也有催化大分子亚砜底物不对称氧化的能力[20]。因此，选择 P450 BM3 和 $CHMO_{NCIMB\ 9871}$ 为模板，在 NCBI 数据库中进行同源性检索，筛选出氨基酸序列同源性为 20%~90% 的酶作为候选酶。

1.3 重组质粒的转化

将 *E. coli* BL21 感受态细胞置于冰上 5 min，待其完全融化后，取 1 μL 重组质粒加入 30 μL 感受态细胞中，轻柔混匀并在冰上静置 30 min。冰浴结束后，将离心管转移至 42 ℃金属浴上热激 60 s，热激后立即将离心管冰浴 5 min。随后，将细胞转移至摇床中，在 37 ℃、200 r/min 条件下培养 1 h。取出培养后的菌液，在 10 000 r/min 下离心 1 min，弃去一半上清液，将剩余菌液混匀。取 200 μL 菌液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上，将平板置于 37 ℃恒温摇床上培养 12 h，直至长出较大的菌落。

1.4 重组菌株的诱导和表达

挑取重组菌株接种至 10 mL 试管中，加入 10 μL 1 mol/L 的卡那霉素抗生素溶液，将试管置于 37 ℃恒温摇床，以 200 r/min 培养 6~8 h。随后，将试管转接至 800 mL 的 LB 培养基中，加入 800 μL 1 mol/L 的硫酸卡那霉素抗生素溶液，在 37 ℃、200 r/min 条件下培养 1~2 h，直至菌液 OD_{600} 值达到 0.6。将培养温度降至 20 ℃，然后加入 IPTG 至终浓度为 0.15 mmol/L 进行诱导，在 20 ℃、200 r/min 条件下培养 15 h。最后收集菌液进行离心，弃去上清液，得到诱导后的重组细胞。

1.5 粗酶液的获取

取诱导后的菌体，在 8 000 r/min 的条件下离心 10 min，用 0.9 g/dL 的氯化钠溶液重悬细胞，然

后按照菌体质量浓度为0.05 g/mL的标准将其重悬在50 mmol/L的甲酸铵缓冲液中，再用超声破碎仪破碎20 min。破碎后的溶液在12 000 r/min、4 ℃的条件下离心30 min。取上清液置于超滤管中，在3 000 r/min、4 ℃条件下进行超滤浓缩，得到浓缩后的粗酶液。

1.6　奥美拉唑硫脒的不对称氧化反应

反应体系为2 mL，反应溶剂为甲酸铵溶液（pH 9.0）。向体系中分别加入950 μL环己酮单加氧酶和950 μL异丙醇脱氢酶，然后加入底物和辅酶，使底物质量浓度为3 g/L、NADPH浓度为5 mmol/L、FAD浓度为0.05 mmol/L。将反应液混匀后于33 ℃、200 r/min的条件下反应10 h。

1.7　产物分析检测

1）Nova-Pak C18柱样品制备：在反应液中加入3 mL乙酸乙酯进行萃取，然后将混合溶液置于固定摇床上，于200 r/min充分混合20 min。将混合溶液于10 000 r/min离心5 min，取上层乙酸乙酯萃取液，用0.25 μm有机膜进行抽滤，将滤液置于液相小瓶中待测。

2）Nova-Pak C18柱检测：流动相为体积分数53%的乙腈，流量1 mL/min，柱温30 ℃，紫外检测波长254 nm，检测8 min[21]。

3）CHIRALPAK® CBH手性柱样品制备：取200 μL乙酸乙酯萃取液，置于真空浓缩仪中旋干，加入200 μL异丙醇重新溶解，再用0.25 μm有机膜抽滤，将滤液置于液相小瓶中待测。

4）CHIRALPAK® CBH手性柱检测：无机相为1.2 g/L的磷酸二氢钠（pH 6.0），加入37.2 mg乙二胺四乙酸二钠混匀，有机相为异丙醇，无机相与有机相的体积比为95∶5。检测条件为：流量0.4 mL/min，柱温30 ℃，紫外检测波长254 nm，检测15 min。其中，光学纯度的计算见式（1）。

$$e=\frac{A_{API}-A_{IMP}}{A_{API}+A_{IMP}}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

e——奥美拉唑的光学纯度，%；

A_{API}——奥美拉唑的峰面积；

A_{IMP}——奥美拉唑对映异构体的峰面积。

1.8　重组菌株的筛选

按C18柱和CBH手性柱的检测条件对产物标准品进行检测，再对反应液样品进行C18柱和CBH柱检测，通过对比产物标准品出峰时间判断是否有目的产物生成。

1.9　响应面优化

根据单因素试验结果，确定影响该反应的主要因素。设置反应温度（A）、反应pH（B）、FAD添加量（C）为自变量，分别以−1、0、1代表3个自变量的最低值、中间值、最高值，以奥美拉唑产率（y）为响应值设计响应面分析因素及水平，见表2[14]。

表2　响应面分析因素及水平表

Table 2　Factors and levels of response surface methodology

水平	反应温度/℃	反应pH	FAD添加量/（μmol/L）
−1	28.0	9.0	0.03
0	32.5	10.0	0.04
1	37.0	11.0	0.05

1.10　奥美拉唑标准曲线的绘制

使用HPLC外标法对产物进行定量分析。以DMSO为溶剂，配制10个不同浓度的产物标准品溶液，然后将标准品加到2 mL甲酸铵缓冲液（50 mmol/L，pH 9.0）中，再加入等体积的乙酸乙酯，振荡萃取后离心，取上清液进行HPLC检测。奥美拉唑标准曲线见图1。

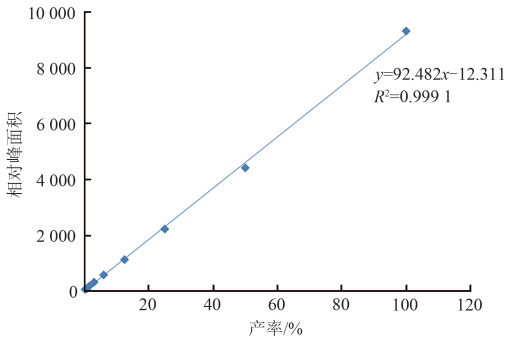


图1　奥美拉唑标准曲线

Fig. 1　Standard curve of omeprazole

2　结果与讨论

2.1　同源酶的挖掘

在NCBI数据库中进行基因检索，见表3。结果表明，以来源于*A. johnsonii*的单加氧酶$CHMO_{NCIMB\ 9871}$为模板共检索到7个序列，以来源于*P. megaterium*的P450 BM3为模板共检索到3个序

表 3 $CHMO_{NCIMB\ 9871}$和 P450 BM3 同源酶挖掘

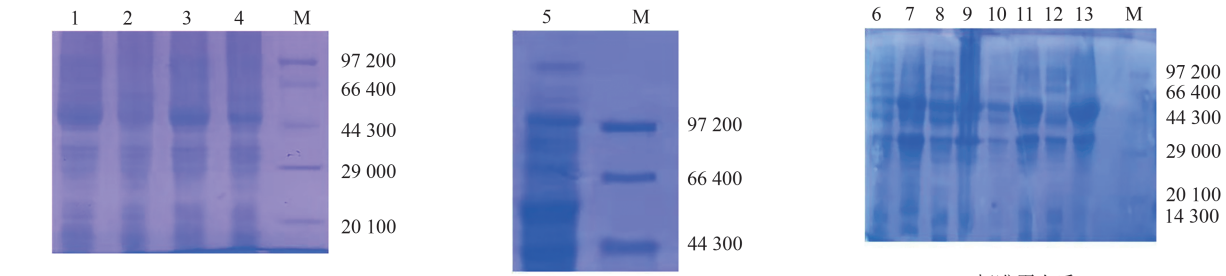
Table 3 Mining of homologous enzymes of $CHMO_{NCIMB\ 9871}$ and P450 BM3

模板	单加氧酶	NCBI 登录号	来源菌株	同源性/%
$CHMO_{NCIMB\ 9871}$	*Rh*CHMO	BAA51652	*Rhodococcus* sp. Phi1	96.1
	*An*CHMO	API23866	*Acinetobacter* sp.	87.3
	*Ad*CHMO	WP_07468415	*Acidovorax* sp.	85.7
	4A9W	CAQ45914	*Stenotrophomonas maltophilia*	79.8
	$CHMO_{KT2440}$	WP_010953714.1	*Pseudomonas* sp.	78.6
	*Sm*KT2440-2	WP_060442509.1	*Serratia marcescens*	76.6
	MLKT2440-3	WP_043309925.1	*Pseudomonas* sp. ML96	75.4
P450 BM3	*Pm*P450 BM3	PAK51892	*P. megaterium*	98.3
	*Sc*P450 BM3	API65466	*Synthetic construct*	97.1
	*Bs*P450 BM3	WP_057244365	*Bacillus* sp. Root 239	98.9

列，并确定这 10 种序列的氨基酸同源性为 75.4%~98.9%。

2.2 单加氧酶的表达

破碎细胞上清液的 SDS-PAGE 结果见图 2，所有酶在重组细胞中均可溶性表达，其中环己酮单加氧酶 *Sc*CHMO、*Bs*CHMO 和 $CHMO_{KT2440}$，P450 酶的 4O4P 和 *Pm*P450 BM3 的目的蛋白质条带较明显，蛋白质表达水平较高。



M—标准蛋白质；
1—*E. coli* BL21/$CHMO_{NCIMB\ 9871}$破碎上清液；
2—*E. coli* BL21/*Rh*CHMO破碎上清液；
3—*E. coli* BL21/*Sc*CHMO破碎上清液；
4—*E. coli* BL21/*Bs*CHMO破碎上清液。

(a) CHMO重组菌中的蛋白质表达

M—标准蛋白质；
5—*E. coli* BL21/$CHMO_{KT2440}$破碎上清液。

(b) $CHMO_{KT2440}$重组菌中的蛋白质表达

M—标准蛋白质；
6—*E. coli* BL21/WTP450 BM3破碎上清液；
7—*E. coli* BL21/*Sc*P450 BM3破碎上清液；
8—*E. coli* BL21/*Bs*P450 BM3破碎上清液；
9—*E. coli* BL21/4O4P破碎上清液；
10—*E. coli* BL21/*Pm*P450 BM3破碎上清液；
11—*E. coli* BL21/*Sc*P450 BM3破碎上清液；
12—*E. coli* BL21/*Bs*P450 BM3破碎上清液；
13—*E. coli* BL21/4O4P破碎上清液。

(c) P450重组菌中的蛋白质表达

图 2 3 种加氧酶在重组菌中的蛋白质表达结果

Fig. 2 SDS-PAGE results of expression of three monooxygenases in recombinant strains

2.3 单加氧酶的筛选

以 12 种单加氧酶为生物催化剂，奥美拉唑硫脒为底物进行转化反应，初步探索这些酶是否具有催化合成奥美拉唑的功能。结果如表 4 所示，有 10 种单加氧酶能催化转化奥美拉唑硫脒并产生奥美拉唑。通过 HPLC 检测发现，底物的出峰位置在 3.34 min，产物的出峰位置在 5.21 min。

这 10 种酶催化合成产物时在产率和光学纯度方面存在差异，其中环己酮单加氧酶 $CHMO_{KT2440}$ 催化合成奥美拉唑的产率和光学纯度最高，分别为 42.40% 和 97.6%。因此，后续研究选取 $CHMO_{KT2440}$ 进行蛋白质表达条件及生物转化条件优化。

2.4 环己酮单加氧酶 $CHMO_{KT2440}$ 蛋白质表达条件优化

对 $CHMO_{KT2440}$ 蛋白质表达的诱导温度及诱导剂 IPTG 浓度进行优化。分别在不同温度（17、20、23、25、28 ℃）下进行蛋白质诱导，取细胞上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 3。$CHMO_{KT2440}$ 在 17 ℃诱导时目标蛋白质条带信号最强，表达最好。基于温度优化的结果，进一步在 17 ℃测试 IPTG 浓度（0.10、0.15、0.20、0.30、0.40 mmol/L）对表达效果的影响。结果表明，当 IPTG

表4　不同单加氧酶催化合成奥美拉唑的产率及光学纯度

Table 4　Yields and optical purity of omeprazole synthesized under the catalysis of different monooxygenases

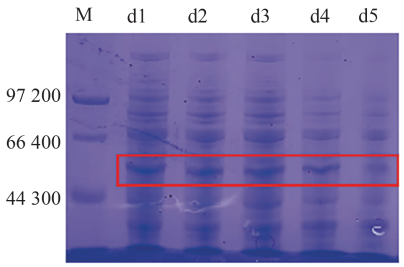
单加氧酶	产率/%	光学纯度/%
4A9W	0.60	62.3
*Rh*CHMO	0.80	76.8
*An*CHMO	1.20	76.2
*Ad*CHMO	0.40	71.5
$CHMO_{NCIMB\ 9871}$	1.20	68.6
4O4P	0.20	82.5
*Pm*P450 BM3	0	0
*Sc*P450 BM3	0.60	65.3
*Bs*P450 BM3	0	0
$CHMO_{KT2440}$	42.40	97.6
*Sm*KT2440-2	29.34	77.7
MLKT2440-3	20.21	69.8

浓度为0.15 mmol/L时，目标蛋白质条带最清晰，表达最佳。因此，确定$CHMO_{KT2440}$蛋白质表达的最佳诱导温度为17 ℃，IPTG浓度为0.15 mmol/L，该条件获得的重组蛋白可用于后续奥美拉唑的生物转化。

2.5　环己酮单加氧酶$CHMO_{KT2440}$催化合成奥美拉唑的条件优化

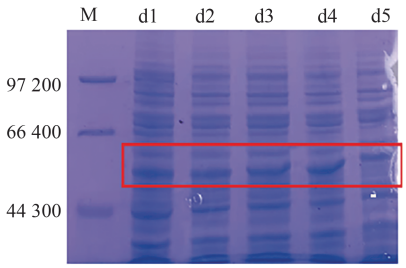
2.5.1　反应温度和pH优化

反应温度对粗酶催化反应至关重要，酶活力会随温度升高而增强，但是温度过高会导致酶变性失活[16]。选取5个温度（28、30、33、37、40 ℃）进行转化反应，结果见图4。当反应温度为33 ℃时，转化效果最好，此时产率达28.3%，光学纯度为97.3%。



M—标准蛋白质；
d1—诱导温度17 ℃；d2—诱导温度20 ℃；
d3—诱导温度23 ℃；d4—诱导温度25 ℃；
d5—诱导温度28 ℃。

(a) 诱导温度优化

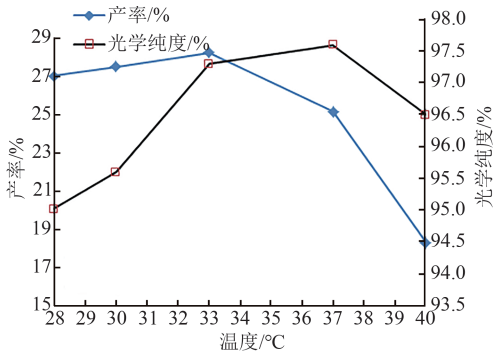


M—标准蛋白质；
d1—IPTG浓度为0.40 mmol/L；d2—IPTG浓度为0.30 mmol/L；
d3—IPTG浓度为0.20 mmol/L；d4—IPTG浓度为0.15 mmol/L；
d5—IPTG浓度为0.10 mmol/L。

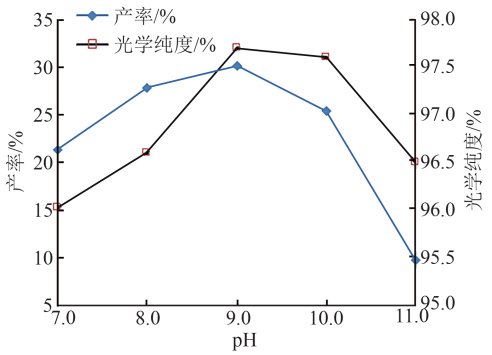
(b) IPTG浓度优化

图3　重组$CHMO_{KT2440}$蛋白质表达优化

Fig. 3　Optimization of protein expression of the recombinant $CHMO_{KT2440}$



(a) 转化温度优化



(b) 转化pH优化

图4　$CHMO_{KT2440}$转化反应中温度和pH的优化

Fig. 4　Optimization of temperature and pH value during $CHMO_{KT2440}$-mediated biotransformation

根据文献报道，$CHMO_{KT2440}$酶在弱碱性环境中具有更高的活性[17]，因此考察了$CHMO_{KT2440}$在不同pH（7.0、8.0、9.0、10.0、11.0）缓冲液中的催化效率，发现当pH为9.0时，合成奥美拉唑的效果最好，产率为30.2%，光学纯度为97.7%。

2.5.2　FAD添加量优化

在$CHMO_{KT2440}$催化合成奥美拉唑的过程中，FAD通过转化为过氧化黄素实现底物氧化。不同FAD添加量（0.01、0.02、0.03、0.05、0.10 mmol/L）对转化效果的影响见图5。在不添加FAD时，

$CHMO_{KT2440}$转化率较低，说明粗酶液本身含有少量的FAD辅酶；当FAD浓度低于0.05 mmol/L时，随着FAD浓度的升高，产率随之提高；当FAD浓度超过0.05 mmol/L时，随着FAD浓度的升高，产率急剧下降，说明过量的FAD会抑制转化反应。当FAD浓度为0.05 mmol/L时，奥美拉唑的产率最高，为63.19%，光学纯度为96.9%。因此后续选用0.05 mmol/L的FAD进行转化研究。

2.5.3 底物质量浓度和反应时间优化

环己酮单加氧酶在催化过程中能够进一步氧化亚砜产生无手性砜[4]，因此需确定最佳反应时间避免过度氧化。分别在2、4、6、8、10、12 h取样进行高效液相色谱检测，结果见图6(a)。在反应2~10 h奥美拉唑产率持续上升，在10 h时产率最高达77.1%，光学纯度为97.4%。当反应时间超过10 h后，奥美拉唑的产率开始下降。表明随着反应时间的延长，奥美拉唑会被环己酮单加氧酶继续氧化，生成无手性砜等副产物。

底物质量浓度过高会抑制$CHMO_{KT2440}$的转化效率，对底物质量浓度进行了优化，结果见图6(b)。当底物质量浓度为3.0 g/L时，产率最高达78.9%，光学纯度为97.1%；当底物质量浓度高于3.0 g/L时，随着底物质量浓度的升高，奥美拉唑的产率逐渐下降；当底物质量浓度为10.0 g/L时，产率仅为5.6%。

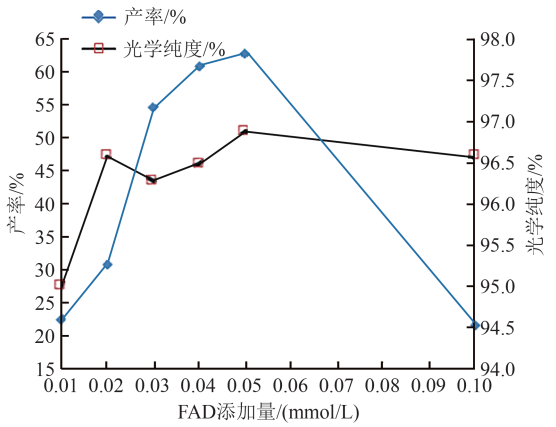
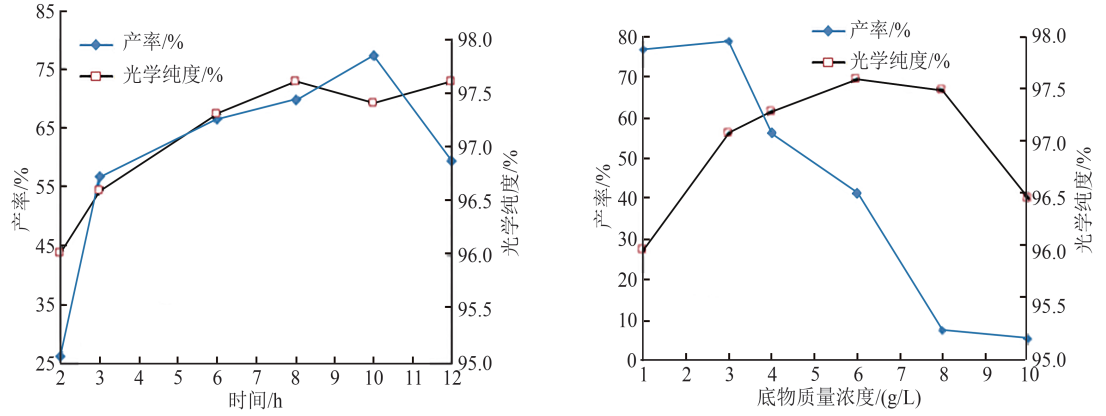


图5 $CHMO_{KT2440}$转化反应中辅酶FAD添加量的优化

Fig. 5 Optimization of coenzyme FAD concentration during $CHMO_{KT2440}$-mediated biotransformation



(a) 转化时间优化 (b) 底物质量浓度优化

图6 $CHMO_{KT2440}$转化反应中转化时间和底物质量浓度的优化

Fig. 6 Optimization of transformation time and substate mass concentration during $CHMO_{KT2440}$-mediated biotransformation

2.6 环己酮单加氧酶$CHMO_{KT2440}$转化试验的响应面优化及验证

选取对产率影响显著的3个因素(反应温度、pH、FAD添加量)进行转化反应的响应面优化试验。采用Design-Expert软件按表1设计试验方案，响应面优化试验结果见表5。

通过方差分析可知，模型的F值为142.78，表示模型显著，见表6。而失拟项的F值为2.49，“P值＞F”值为0.199 6(>0.1)，说明数据点正常，模型显著[19]。

反应温度、pH、FAD添加量的“P值>F”值均<0.000 1，满足<0.05的要求，因此这3项可显著影响反应产率。A^2、C^2的“P值>F”值均<0.000 1，满足<0.05的要求，因此A^2、C^2也可显著影响反应产率。而交互项AB、AC、BC的“P值>F”值均>0.05，因此交互项AB、AC、BC对反应无显著影响。

表5　响应面优化法试验设计与产率

Table 5　Experimental design and product yield of response surface methodology

试验编号	运行序号	反应温度/℃	pH	FAD添加量/（mmol/L）	产率/%
3	5	28.0	10.0	0.03	46.1
1	10	28.0	9.0	0.04	67.7
7	11	28.0	11.0	0.04	28.9
5	12	28.0	10.0	0.05	60.4
14	1	32.5	9.0	0.03	62.1
9	3	32.5	11.0	0.03	22.5
12	4	32.5	10.0	0.04	63.2
11	9	32.5	10.0	0.04	61.8
15	13	32.5	10.0	0.04	61.3
10	14	32.5	10.0	0.04	62.6
13	15	32.5	10.0	0.04	61.2
17	16	32.5	9.0	0.05	76.1
16	17	32.5	11.0	0.05	30.3
2	2	37.0	10.0	0.03	41.5
8	6	37.0	9.0	0.04	61.4
6	7	37.0	11.0	0.04	25.8
4	8	37.0	10.0	0.05	49.4

表6　模型方程方差分析

Table 6　Analysis of variance for the model equation

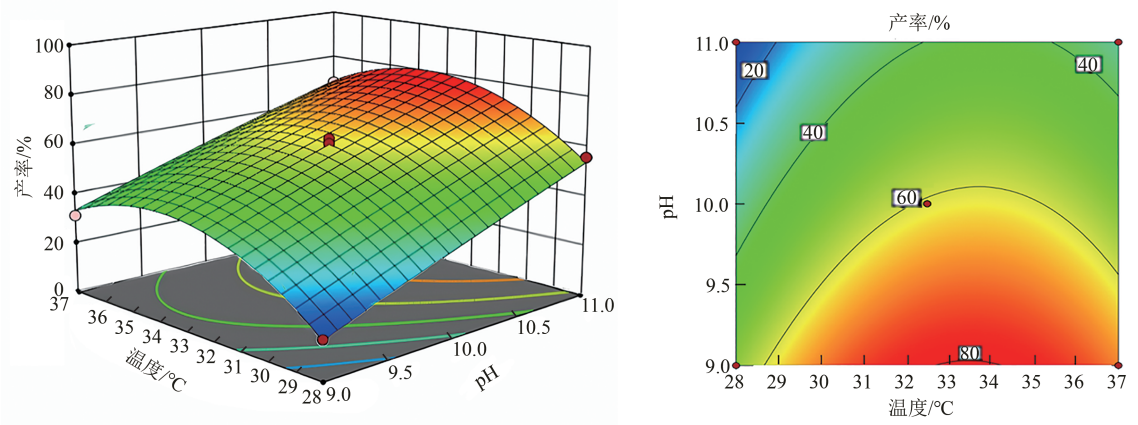
方差来源	平方和	自由度	平均方差	*F*值	*P*值>*F*
模型	6 550.97	9	727.89	142.78	<0.000 1
A	731.53	1	731.53	143.50	<0.000 1
B	3 116.55	1	3 116.55	611.34	<0.000 1
C	729.62	1	729.62	143.12	<0.000 1
AB	12.96	1	12.96	2.54	0.154 9
AC	105.06	1	105.06	20.61	0.002 7
BC	8.70	1	8.70	1.71	0.232 7
A^2	1 370.28	1	1 370.28	268.79	<0.000 1
B^2	2.63	1	2.63	0.52	0.496 0
C^2	373.23	1	373.23	73.21	<0.000 1
残差	35.69	7	5.10		
失拟项	23.24	3	7.75	2.49	0.199 6
纯误差	12.45	4	3.11		
总误差	6 586.66	16			

模型方程误差统计分析结果见表7，预测R^2与调整后的R^2差值小于0.2，R^2为0.994 6，证明方程能有效表征变量间关系[4]。最终拟合出的回归方程为：y=60.78+9.56A−19.74B+9.55C+1.8AB+5.13AC+1.48BC−18.04A^2−0.79B^2−9.41C^2。通过对响应面分析得到了响应面的三维空间曲面图和等高线图，见图7~9。在三维曲线图中均

表7　模型方程误差统计分析表

Table 7　Statistical analysis of the model equation error

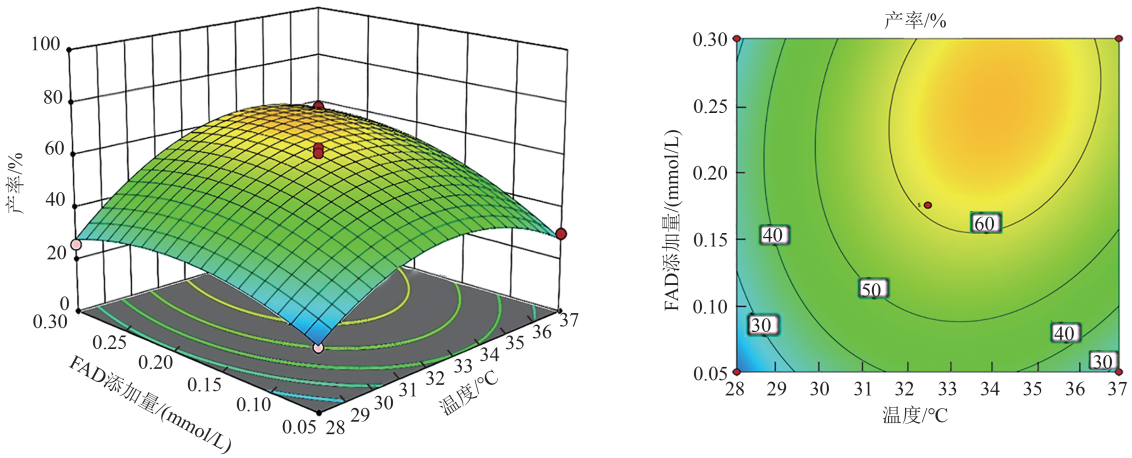
统计项目	数值
标准偏差	2.26
均值	47.49
多元相关系数	0.994 6
实际多元相关系数	0.987 6
预测多元相关系数	0.940 6
精密度	39.000 7



(a) pH与温度交互作用响应面图　(b) pH与温度交互作用等高线图

图 7　pH 与温度交互作用响应面图和等高线图

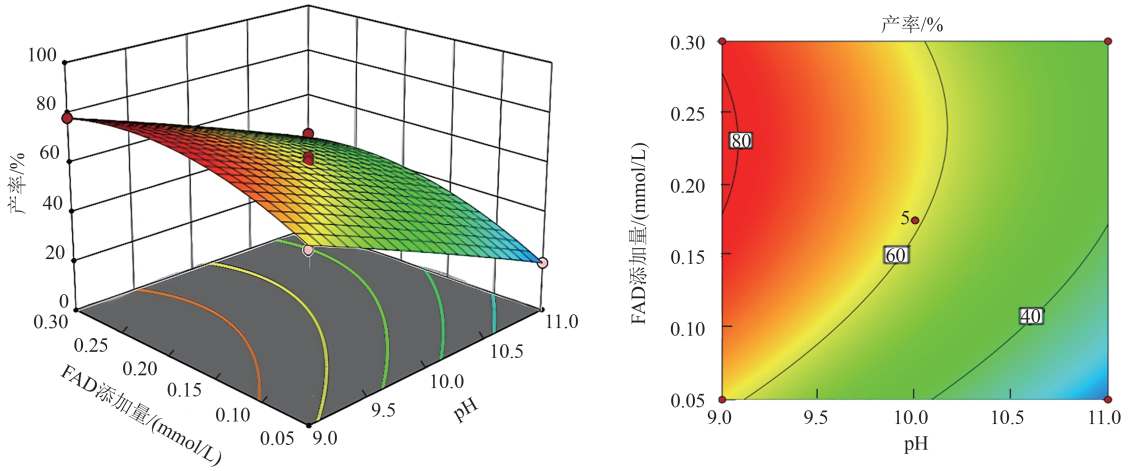
Fig. 7　Response surface map and contour plot map of the interaction between pH and temperature



(a) FAD添加量与温度交互作用响应面图　(b) FAD添加量与温度相互作用等高线图

图 8　FAD 添加量与温度交互作用响应面图和等高线图

Fig. 8　Response surface map and contour plot map of the interaction between FAD concentration and temperature



(a) FAD添加量与pH交互作用响应面图　(b) FAD添加量与pH交互作用等高线图

图 9　FAD 添加量与 pH 交互作用响应面图和等高线图

Fig. 9　Response surface map and contour plot map of the interaction between FAD concentration and pH

可以看到很明显的极值点，解回归方程得到极值点为：A=33.789 1、B=9.051 53、C=0.048 985 3。经取整优化，确定最佳反应条件为：反应温度34 ℃、pH 9.0、FAD添加量0.05 mmol/L。为验证响应面试验优化得到的最佳反应条件，进行了3次验证，得到的产率分别为79.8%、80.1%、80.0%，平均产率为79.9%，与理论最高产率80.8%相近，证明模型可靠。

3　结论

为高效合成奥美拉唑，作者筛选到了一株能够高效转化合成奥美拉唑的环己酮单加氧酶$CHMO_{KT2440}$。经SDS-PAGE分析，该酶可溶性表达良好，在初始反应条件下奥美拉唑产率为42%。经过蛋白质表达优化，确定了该酶的最优表达温度为17 ℃，IPTG终浓度为0.15 mmol/L。进一步通过响应面优化，确定$CHMO_{KT2440}$粗酶转化奥美拉唑的最适条件为：底物质量浓度3.0 g/L，反应温度34 ℃，反应时间10 h，反应pH 9.0，FAD添加量0.05 mmol/L。在此条件下，奥美拉唑平均产率提升至79.9%，较优化前提高了90.23%，实现了其产率的大幅度提高，为工业化生产奥美拉唑奠定了基础。后续将重点开展底物浓度梯度优化与反应体系放大研究，进一步提高其产率及工业化生产的可能性。

参考文献

[1] 尹江燕．消化性溃疡药物治疗的进展[J]．医学综述，2013，19(11)：2000-2002．
YIN J Y．Progress in pharmacotherapy of peptic ulcer[J]．Medical Recapitulate，2013，19(11)：2000-2002．(in Chinese)

[2] WANG L Y，ZHOU L L．Intelligent hospital and clinical effect of omeprazole in the treatment of patients with gastric ulcer based on embedded system [J]．Microprocessors and Microsystems，2021，81：103651．

[3] 张伟东，申兵，童锋．急性胃炎应用阿托品联合奥美拉唑方案治疗的效果评估[J]．海峡药学，2017，29(12)：196-197．
ZHANG W D，SHEN B，TONG F．Evaluation of the effect of atropine combined with omeprazole in the treatment of acute gastritis [J]．Strait Pharmaceutical Journal，2017，29(12)：196-197．(in Chinese)

[4] BAŞ D，BOYACI İ H．Modeling and optimization II：comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction [J]．Journal of Food Engineering，2007，78(3)：846-854．

[5] 马金焕，臧营．奥美拉唑合成研究[J]．山东化工，2018，47(13)：32，34．
MA J H，ZANG Y．Synthesis of omeprazole [J]．Shandong Chemical Industry，2018，47(13)：32，34．(in Chinese)

[6] YOSHIDA T，KITO M，TSUJII M，et al．Microbial synthesis of a proton pump inhibitor by enantioselective oxidation of a sulfide into its corresponding sulfoxide by *Cunninghamella echinulata* MK40 [J]．Biotechnology Letters，2001，23(15)：1217-1222．

[7] MIRZA I A，YACHNIN B J，WANG S Z，et al．Crystal structures of cyclohexanone monooxygenase reveal complex domain movements and a sliding cofactor [J]．Journal of the American Chemical Society，2009，131(25)：8848-8854．

[8] RÖLLIG R，PAUL C E，CLAEYS-BRUNO M，et al．Divorce in the two-component BVMO family：the single oxygenase for enantioselective chemo-enzymatic baeyer-villiger oxidations [J]．Organic & Biomolecular Chemistry，2021，19(15)：3441-3450．

[9] WALSH C，LATHAM J．Mechanism-based inactivation of the flavoprotein cyclohexanone monooxygenase by S oxygenation[J]．Journal of Protein Chemistry，1986，5(2)：79-87．

[10] ESER B E，ZHANG Y，ZONG L，et al．Self-sufficient Cytochrome P450s and their potential applications in biotechnology [J]．Chinese Journal of Chemical Engineering，2021，30：121-135．

[11] GIRVAN H M，LEVY C W，WILLIAMS P，et al．Glutamate-haem ester bond formation is disfavoured in flavocytochrome P450 BM3：characterization of glutamate substitution mutants at the haem site of P450 BM3[J]．Biochemical Journal，2010，427(3)：455-466．

[12] ZHANG J D，LI A T，XU J H．Improved expression of recombinant cytochrome P450 monooxygenase in *Escherichia coli* for asymmetric oxidation of sulfides[J]．Bioprocess and Biosystems Engineering，2010，33(9)：1043-1049．

[13] 张博，史永吉，杨辉，等．通过发酵优化提高大肠杆菌生产*L*-半胱氨酸产量[J]．食品与发酵工业，2021，47(18)：175-180．

ZHANG B, SHI Y J, YANG H, et al. Enhancement of *L*-cysteine production in *Escherichia coli* through fermentation optimization[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 175-180.(in Chinese)

[14] KALIL S J, MAUGERI F, RODRIGUES M I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(6): 539-550.

[15] DINARVAND M, REZAEE M, MASOMIAN M, et al. Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra- and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 508968.

[16] 刘细霞, 王弘, 杨金易, 等. 抗克伦特罗单链抗体-碱性磷酸酶融合蛋白表达条件的初步研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 161-165.
LIU X X, WANG H, YANG J Y, et al. Expression conditions of the recombinant anticlenbuterol single-chain Fv antibody-alkaline phosphatase fusion protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(9): 161-165.(in Chinese)

[17] 郑禾, 周玉珂, 林贤福, 等. Baeyer-Villiger单加氧酶的蛋白质改造及其催化氧化反应研究新进展[J]. 有机化学, 2019, 39(4): 903-915.
ZHENG H, ZHOU Y K, LIN X F, et al. Recent developments in protein engineering and catalytic oxidations of Baeyer-Villiger monooxygenase[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2019, 39(4): 903-915.(in Chinese)

[18] 许冰, 贾爱芳, 赵文献. 温度对酶活性的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(7): 28.
XU B, JIA A F, ZHAO W X. Effect of temperature on enzyme activity[J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2010, 3(7): 28.(in Chinese)

[19] MOHAMAD N R, MARZUKI N H C, BUANG N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(2): 205-220.

[20] TOLMIE C, AIDO-MACHADO R, FERRONI F M, et al. Natural variation in the 'control loop' of BVMOAFL210 and its influence on regioselectivity and sulfoxidation[J]. Catalysts, 2020, 10(3): 339.

[21] 石金芳, 王燕, 苏梦翔, 等. 高效液相色谱法手性拆分奥美拉唑对映异构体[J]. 药学与临床研究, 2014, 22(4): 329-331.
SHI J F, WANG Y, SU M X, et al. Determination of omeprazole enantiomers by chiral HPLC[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2014, 22(4): 329-331.(in Chinese)

（责任编辑：刘冬梅）