

# 微生物酶不对称水解合成S(+)-布洛芬的研究<sup>\*</sup>

## I. 高度立体选择性菌株的筛选

徐诗伟 曹桂芳 徐 清 王维庆<sup>\*\*</sup> 左 静

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 从361株细菌和酵母菌中分别筛选到12株可不对称水解布洛芬乙酯生成R(-)-布洛芬的细菌(5株菌对映体过量(ee)可达85%)和15株具有不对称水解布洛芬乙酯活性的酵母菌,其中皮状丝孢酵母T158生成S(+)-布洛芬,ee可超过92%。该酵母菌最适碳源为葡萄糖,浓度以1.0—1.5%适宜,蛋白胨浓度低于0.3%或高于0.5%对水解拆分均不利。酵母膏的加入显著提高水解活性,最适浓度0.3%。在培养基中添加表面活性剂吐温80(0.2%)既可提高拆分专一性,又能增强水解能力。

**关键词** 皮状丝孢酵母, 不对称水解, S(+)-布洛芬

布洛芬(ibuprofen)的化学名2-(4-异丁基苯)-丙酸,为2-芳基丙酸(2-APA)类药物,属非甾体抗炎药(NSAID),是解热镇痛、消炎抗风湿的基本药物和主要产品。其 $\alpha$ 位含有一个手性碳原子,存在一对光学活性对映体,其中S(+)-布洛芬具有高的生理活性,为R(-)-布洛芬的160倍。而在人体内,无活性的R(-)-布洛芬可特异地转化为S(+)-布洛芬,平均转化率在30%之内<sup>[1-3]</sup>。用一般化学反应合成的布洛芬为外消旋体,新的临床研究表明,S(+)-布洛芬比消旋体具有更高的疗效,且副作用小<sup>[4-7]</sup>。近年来,已有不少关于利用圆柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)脂肪酶(lipase)(简称CCL)拆分消旋醇和羧酸的报道<sup>[8,9]</sup>,CCL拆分途径主要为立体选择性的酯水解、酯化和转酯作用<sup>[10]</sup>。而用CCL立体选择性的酯水解和酯化制备S(+)-布洛芬<sup>[11-15]</sup>,通常比用手性衍生试剂化学拆分<sup>[16,17]</sup>简便,得到产物光学纯度高。本文报道不对称水解布洛芬乙酯的菌种筛选以及一株几乎无脂肪酶活力但具有高度立体选择性的酵母T158的培养条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 微生物菌种

筛选用151株细菌及175株酵母由本研究组保藏;另35株酵母由本所保藏室提供。

• 国家重点科技攻关项目部分工作。

本所博士研究生白逢彦协助酵母T158的菌种鉴定。

•• 山东新华制药厂研究院。

本文于1993年8月14日收到。

细菌用肉汁琼脂斜面,酵母用麦芽汁琼脂斜面保存。酵母 T158 鉴定为皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*)。

## 1.2 布洛芬及其酯类

消旋布洛芬及其甲酯、乙酯、异丙酯和氯乙酯由山东新华制药厂提供。

## 1.3 培养基

1.3.1 筛选培养基(%)：酵母菌用葡萄糖 2.0, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5, 橄榄油 1.0, 吐温 80 0.5, pH 6.5。细菌用两种培养基：(A) 葡萄糖 2.0, 蛋白胨 1.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{CaCO}_3$  0.5, 橄榄油 1.0, 吐温 80 0.5, pH 7.0; (B) 葡萄糖 2.0, 蛋白胨 0.1, 牛肉膏 0.5,  $\text{NaCl}$  0.5, 橄榄油 1.0, 吐温 80 0.5, pH 7.0。上述培养基 200×20mm 试管装 5ml, 100ml 三角瓶装 15ml, 112.6℃ 湿热灭菌 20min。

1.3.2 基础培养基(%)：葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.2, pH 6.5。100ml 三角瓶装 15ml, 250ml 三角瓶装 40ml, 112.6℃ 湿热灭菌 20min。供皮状丝孢酵母培养条件试验用。

## 1.4 培养与水解反应

初筛用试管,复筛用 100ml 三角瓶进行试验。采用一级培养。将斜面菌种移入新鲜培养基,于 28℃, 200r/min 振荡培养 24h,投加 2% (V/V) 布洛芬消旋酯,在上述条件下水解 72h,按下述方法分析水解反应液。

在皮状丝孢酵母培养条件研究中,采用二级培养,将斜面菌种先移入 40ml 新鲜培养基中,振荡培养 24h,以 1ml 种液移入 15ml 新鲜培养基中,二级培养 24h 测定 pH 以及细胞生长情况;然后投加 2% (V/V) 底物进行水解反应,72h 后测定布洛芬生成量 (C) 和 S(+)-布洛芬的对映体过量 (ee)。

## 1.5 分析方法

1.5.1 细胞生长测定：取 1ml 培养液,加蒸馏水至 10ml 于 620nm 波长比浊。

1.5.2 布洛芬薄层色谱 (TLC) 定性分析：取水解反应液用盐酸酸化至  $\text{pH} \leq 3$ ,以 2 倍体积正己烷提取。提取液点样于已活化的 GF<sub>254</sub> 薄层板上,同时用标准品对照,置于双底展开槽内,用甲苯-醋酸乙酯-醋酸 (70:30:1.5) 上行展开 (展开前预平衡 15min),展距 8cm,于 120℃ 烘烤 10min,于波长 254nm 紫外灯下可观察到完全分离的布洛芬及其酯的暗色斑点,用 0.04% 溴甲酚绿乙醇溶液喷雾,布洛芬将在蓝色背景上呈清晰黄色斑点。

1.5.3 布洛芬生成量 (C) 的测定：布洛芬定量测定采用薄层色谱扫描法 (TLCS)<sup>[18]</sup>,即对上述 TLC 分离后的布洛芬斑点进行原位吸光度扫描。使用瑞士 CAMAG 薄层扫描仪和 SP4290 积分仪。固定狭缝式扫描,氙灯做光源,测定波长为 212nm,自动调零,以外标二点面积校正定量,布洛芬生成量 (C) 计算如下:

$$C(\text{g/L}) = \frac{W}{\frac{V_1}{V_2} \cdot V_3}$$

式中  $W$  试样中布洛芬含量 ( $\mu\text{g}$ , 由标准品峰面积计算);  $V_1$  取样体积 (ml);  $V_2$  提取溶剂体积 (ml);  $V_3$  点样量 ( $\mu\text{l}$ )。

1.5.4 S(+)-布洛芬 ee (%) 的测定：采用手性固定相高效液相色谱法 (HPLC-CSP)<sup>[19]</sup>

测定。将衍生后的布洛芬的 N,N-(二苯基)酰胺溶液进样 HPLC 系统。使用法国 GILSON HPLC 仪和 CAMAG SP4290 积分仪; CSP 选用共价型 N-3, 5-二硝基苯甲酰(R)-苯甘氨酸(5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6mm)(Supelco); 流动相正己烷-异丙醇(98:2); 流速 1ml/min; 检测波长 254nm。同时以消旋布洛芬衍生物为外标, 由测量一对对映体峰高比( $H_S/H_R$ ) 计算 S(+)-布洛芬 ee 值:

$$ee(\%) = \frac{(a-b)}{(a+b)} \cdot 100$$

$a$  和  $b$  分别为试样和消旋体中一对酰胺衍生物对映体的  $H_S/H_R$ 。若上述计算 ee 值为负值时, 则表示试样的 R(-)-布洛芬 ee。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌种筛选结果

以不对称水解布洛芬乙酯为指标对 210 株酵母和 151 株细菌进行了筛选。酵母主要为假丝酵母(*Candida*) 丝孢酵母(*Trichosporon*) 和地霉(*Geotrichum*)。细菌以醋酸杆菌(*Acetobacter*) 芽孢杆菌(*Bacillus*) 和假单胞菌(*Pseudomonas*) 为主。经复筛, 得到 15 株具有较强不对称水解布洛芬乙酯能力的酵母菌。表 1 中列出 4 株, 其中生成 S(+)-布洛芬 ee 最高的为几乎无脂肪酶活力的皮状丝孢酵母 T158。另有 3 株酵母生

表 1 酵母筛选结果

Table 1 Screening of yeast

酵母 Yeast	脂肪酶活力* Lipase activity (u/ml)	布洛芬 Ibuprofen C (g/L)	S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee (%)
假丝酵母			
<i>Candida</i> sp. 68	54	3.93	77.5
解脂假丝酵母			
<i>C. lipolytica</i> 80	97	4.88	81.5
解脂假丝酵母			
<i>C. lipolytica</i> 92	236	4.21	65.7
皮状丝孢酵母			
<i>Trichosporon cutaneum</i> 158	2.5	3.07	92.1

\* 参见文献 [20] See reference [20].

成 R(-)-布洛芬, ee 值均较低, 约 25%。细菌中具有较强水解拆分能力的有 12 株, 皆生成 R(-)-布洛芬, 其中 5 株菌 ee 较高, 约为 85% (表 2)。

筛选结果表明, 皮状丝孢酵母不仅具有高度立体选择性水解布洛芬乙酯生成 S(+)-布洛芬的专一性, 而且有较高水解活性。为此, 选择该菌为材料进行培养条件的研究。

表2 细菌筛选结果  
Table 2 Screening of bacteria

细菌 Bacteria	布洛芬 Ibuprofen C (g/L)	R(-)-布洛芬 R(-)-Ibuprofen ee (%)
醋酸杆菌 <i>Acetobacter</i> sp. 23	1.83	86.2
醋酸杆菌 <i>Acetobacter</i> sp. 28	1.61	84.6
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp. 85	1.75	84.5
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp. 90	2.67	85.9
假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. 103	2.56	85.1

## 2.2 培养条件

**2.2.1 蛋白胨浓度对拆分的影响:** 用不同蛋白胨浓度的基础培养基进行培养, 结果(图1)表明, 蛋白胨浓度低于0.3%时, 随浓度减少细胞生长减弱, 水解活性也显著递减, 且拆分专一性也略有下降。若蛋白胨浓度高于0.5%时, 拆分专一性随浓度增加而明显降低。适宜的蛋白胨浓度在0.3—0.5%之间。

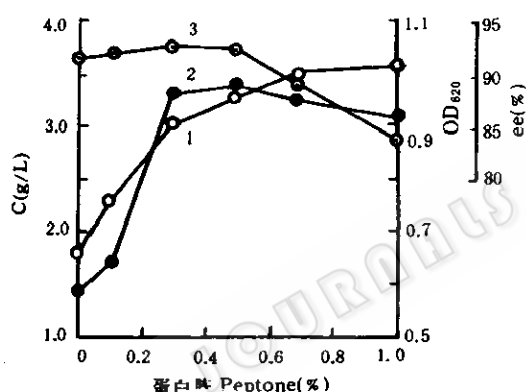


图1 蛋白胨对拆分的影响

Fig. 1 Effect of peptone on resolution

1. 吸光度 OD;
2. 布洛芬 Ibuprofen C;
3. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee.

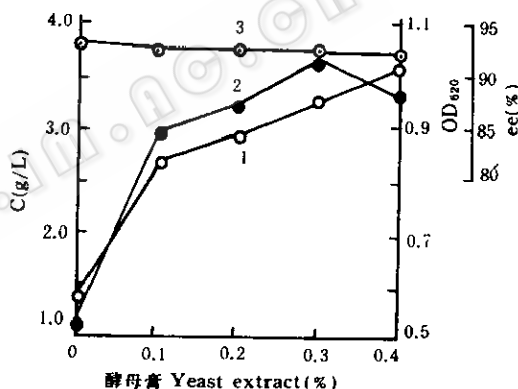


图2 酵母膏对拆分的影响

Fig. 2 Effect of yeast extract on resolution

1. 吸光度 OD;
2. 布洛芬 Ibuprofen C;
3. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee.

**2.2.2 酵母膏浓度对拆分的影响:** 改变基础培养基中酵母膏浓度, 结果(图2)表明, 酵母膏浓度在0.4%以内不影响拆分专一性, 但对水解活性有较大影响。酵母膏浓度低于0.3%, 水解活性随浓度减低而明显下降, 最适浓度为0.3%。

**2.2.3 葡萄糖浓度对拆分的影响:** 结果(图3)表明, 在基础培养基中葡萄糖浓度以1.0—1.5%为宜, 浓度低于1.0%或高于1.5%对拆分专一性和水解活性均不利。

**2.2.4 不同碳源对水解反应的影响:** 在基础培养基中葡萄糖改用不同碳源(浓度不变), 并加入0.1%吐温80。结果(表3)表明, 以葡萄糖为碳源水解活性最强, 而脂类物质如豆油和橄榄油较差。

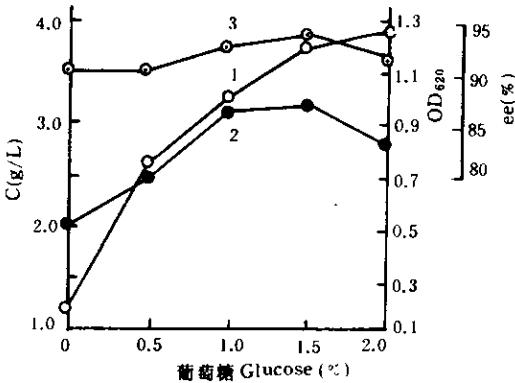


图 3 葡萄糖对拆分的影响

Fig. 3 Effect of glucose on resolution

- 1. 吸光度 OD<sub>620</sub>;
- 2. 布洛芬 Ibuprofen C;
- 3. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee.

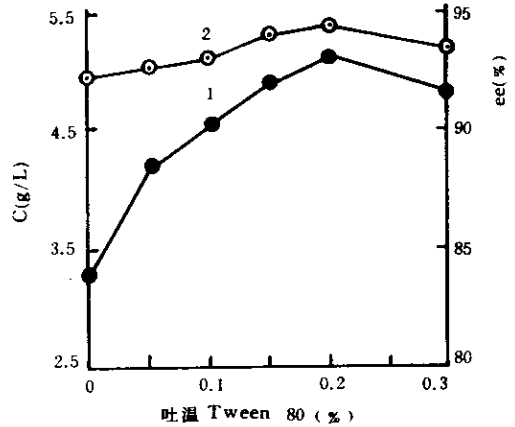


图 4 吐温 80 对拆分的影响

Fig. 4 Effect of tween 80 on resolution

- 1. 布洛芬 Ibuprofen C;
- 2. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee.

表 3 不同碳源对水解反应的影响

Table 3 Effect of various carbon sources on resolution

碳 源 Carbon source	菌生长 Growth (OD <sub>620</sub> )	布洛芬 Ibuprofen C (g/L)
葡萄糖 Glucose	0.93	3.94
可溶性淀粉 Soluble starch	0.84	2.49
蔗糖 Sucrose	1.03	3.52
甘露糖醇 Mannitol	0.52	2.20
丙三醇 Glycerol	1.45	2.24
豆油 Soya oil	1.11	1.87
橄榄油 Olive oil	1.60	1.82

2.2.5 吐温对拆分的影响：图 4 看出，在基础培养基中添加吐温 80，在 0.2% (W/V) 浓度范围内随吐温 80 增加，拆分专一性和水解活性均明显递增，当吐温浓度超过 0.2% 时，略有回落。因此以添加 0.2% 吐温 80 为最佳，布洛芬生成量可超过 5g/L，S (+) - 布洛芬 ee ≥ 94%。

2.2.6 培养基 pH 对拆分的影响：用 HCl 或 NaOH 溶液分别将培养基初始 pH 调至 4.0—8.0 范围内观察其影响。结果（图 5）表明，培养基 pH 在 5.0—6.5 范围内有利于菌的生长，在 6.5—7.0 时，水解酶活力最强，而在 pH4.0—8.0 之内，拆分专一性较恒定。

2.2.7 生长过程及培养时间对拆分的影响：结果（图 6）表明了 48h 内细胞的生长过程以及在不同培养时间投加底物进行不对称水解反应的结果。可见在 8h 内菌的生长处于

旺盛的对数期,此时内投料,对菌的继续生长和产酶会产生一定抑制作用,布洛芬生成量在3g/L的水平上缓慢增长;而达到生长平衡期后,布洛芬生成量迅速提高,在16—24h内投料,布洛芬生成量恒定在较高水平上(可达5g/L以上);24h之后投料,菌水解酶活性逐渐下降。在整个48h内,酶的拆分专一性始终保持较高的稳定性。

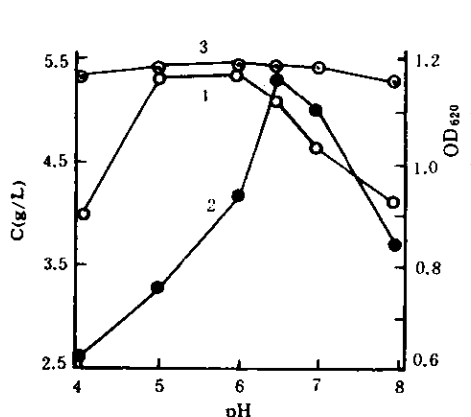


图5 培养基 pH 对拆分的影响

Fig. 5 Effect of liquid medium pH on resolution

1. 吸光度 OD<sub>620</sub>;
2. 布洛芬 Ibuprofen C;
3. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee.

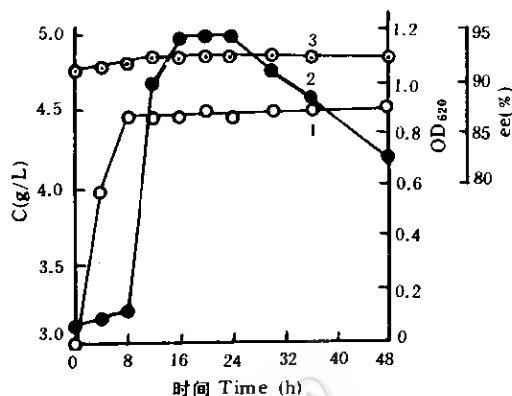


图6 培养时间对拆分的影响

Fig. 6 Time course of growth and effect of culture time on resolution

1. 吸光度 OD<sub>620</sub>;
2. 布洛芬 Ibuprofen C;
3. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee.

## 参 考 文 献

- [1] Adams S S, Bresloff P, Mason C G. *J Pharm Pharmacol*, 1976, **28**: 256—257.
- [2] Brune K, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S. *J Clin Pharmacol*, 1992, **32**: 944—952.
- [3] Oliary J, Tod M, Nicolas P *et al.* *Biopharm Drug Dispos*, 1992, **13**: 337—344.
- [4] Sunshine A, Laska E M. U S Pat, 1989, 4851144.
- [5] Loew D, Schuster O, Lukas H. U S Pat, 1989, 4877620.
- [6] Sunshine A, Laska E M. WO, 1990, 90/14081.
- [7] Evans A M. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992, **42**: 237—256.
- [8] Santaniello E, Ferraboschi P, Grisenti P *et al.* *Chem Rev*, 1992, **92**: 1071—1140.
- [9] 徐诗伟, 徐清. *微生物学通报*, 1993, **20**: 232—237.
- [10] Cambou B, Klivanov A M. *Biotechnol Bioeng*, 1984, **26**: 1449—1454.
- [11] Cesti P, Piccardi P. Eur Pat, 1986, 0195717.
- [12] Sih C J. Eur Pat, 1987, 0227078.
- [13] Matson S L, Wald S A, Zepp C M *et al.* U S Pat, 1991, 5077217.
- [14] Mustrant A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **38**: 61—66.
- [15] Hedstrom G, Backlund M, Slotte J P. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42**: 618—624.
- [16] Piccolo O, Spreafico F, Visentin G *et al.* *J Org Chem*, 1987, **52**: 10—14.
- [17] Larsen R D, Corley E G, Davis P *et al.* *J Am Chem Soc*, 1989, **111**: 7650—7651.
- [18] 徐诗伟, 徐清, 王维庆. *微生物学通报*, 1993, **20**: 311—313.
- [19] 徐诗伟, 徐清, 曹桂芳, 等. *微生物学通报*, 1993, **20**: 371—374.
- [20] Tomizuka N, Ota Y, Yamada K. *Agric Biol Chem*, 1966, **30**: 576—584.

**SYNTHESIS OF S(+)-2-(4-ISOBUTYLPHENYL)PROPIONIC  
ACID BY ASYMMETRIC HYDROLYSIS OF MICROBIAL ENZYME  
I. SCREENING OF HIGH STEREOSELECTIVE MICROORGANISMS**

Xu Shiwei Cao Guifang Xu Qing Wang Weiqing Zuo Jing

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

**Abstract** Microorganisms that hydrolyze ( $\pm$ )-ethyl-2-(4-isobutylphenyl) propionate were screened from 361 strains. 12 strains of bacteria preferentially hydrolyzed (R)-isomer of the racemic ester to produce R(-)-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid. Five of them showed higher specificity of resolution about 85% ee. 15 strains of yeasts have the activity of resolution. Among others, the *Trichosporon cutaneum* 158 preferentially hydrolyzed (S)-isomer to produce S(+)-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid with 92% ee. Adding tween 80 in the liquid medium (pH 6.5) can improve the specificity of resolution and increase the activity of hydrolysis obviously.

**Key words** *Trichosporon cutaneum*, Asymmetric hydrolysis, S (+)-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid