微 生 物 学 报 35(4): 275—279, 1995
Acta Microbiologica Sinica

微生物酶不对称水解合成 S(+)-布洛芬的研究*

II. 反应条件和产物提取

徐诗伟 徐 清 曹桂芳 王维庆**
(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 皮状丝孢酵母具有较强不对称水解底物专一性。在试验的五种布洛芬消旋酯中,水解甲酯和异丙酯生成 S(+)-布洛芬 ee 可达 97%,乙酯为 93%以上;而水解活性以乙酯最强,转化率高于 30%。不对称水解最适 pH6.5—7.0;温度在 28—37℃范围内拆分能力无明显差别。该酵母的水解酶为胞内酶,将酵母细胞制成丙酮干粉进行水解可提高立体专一性。产物 S(+)-布洛芬可借助于酸碱反应和有机溶剂提取得到,同时回收未水解的酯。

关键词 皮状丝孢酵母,不对称水解,S(+)-布洛芬

前文[1]已报道了包括酵母和细菌两类微生物共 361 株菌不对称水解布洛芬乙酯的筛选结果,从中得到一株具有高度立体选择性的酵母 T158,鉴定为皮状丝孢酵母(*Trichosporon cutaneum*),并对该酵母培养条件进行了研究。本文将继续介绍酵母 T158 立体控制合成 S(+)-布洛芬的反应条件及产物的提取结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

皮状丝孢酵母 158 由筛选得到[1]。

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;丙烯酯为北京大学化学系研究生协助合成。

1.3 培养基(%)

葡萄糖 1.0,蛋白胨 0.3,酵母膏 0.3,吐温 80 0.2,pH6.5. 100ml 三角瓶装 15ml 培养基,250ml 三角瓶分别装 40ml 培养基(作种液)或 80ml 培养基(供产物提取用),0.06MPa 灭菌 20min。

1.4 培养与不对称水解反应

将于 28℃生长 2d 的 T158 麦芽汁琼脂斜面培养物移入新鲜培养基,于 28℃,200r/min 震荡培养 24h,接种于新鲜培养基内经 18h 培养后,投加 2%(*v*/*v*)布洛芬消旋酯,然后在上述培养条件下进行不对称水解反应,转化 70h。

---

* 国家重点科技攻关项目部分工作。
** 山东新华制药厂研究院。
本文于 1993 年 10 月 19 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.5 分析方法

布洛芬生成量（C）的测定除前文[2]用薄层色谱扫描法（TLCS）外，还建立了快速碱法紫外测定方法，该法在测定布洛芬 4—16μg/ml 范围内呈良好线性关系，最大相对标准误差在 4%之内。取一定量水解反应液的正己烷提取液，以等体积 5% NaOH 溶液反应使布洛芬定量转化为钠盐，然后取碱层 50μl 于 10ml 比色管内，用蒸馏水稀释至刻度，摇匀后于 Beckman DU7 分光光度计（美国）测定 221nm 处吸光度，由相应布洛芬标准品所得回归方程求得试样中布洛芬生成量（C），按下式计算转化率（T）：

$$T(\%)=\frac{C}{C_s}\cdot\frac{M_s}{M}\cdot 100$$

式中 C_s 和 M_s 分别为布洛芬消旋酯浓度（g/L）和分子量，M 为布洛芬分子量。

S(+)-布洛芬对映体过量（ee）的测定仍用手性高效液相色谱法（HPLC-CSP）[3]。

1.6 S(+)-布洛芬的提取

产物 S(+)-布洛芬的提取分离可按图 1 程序进行。

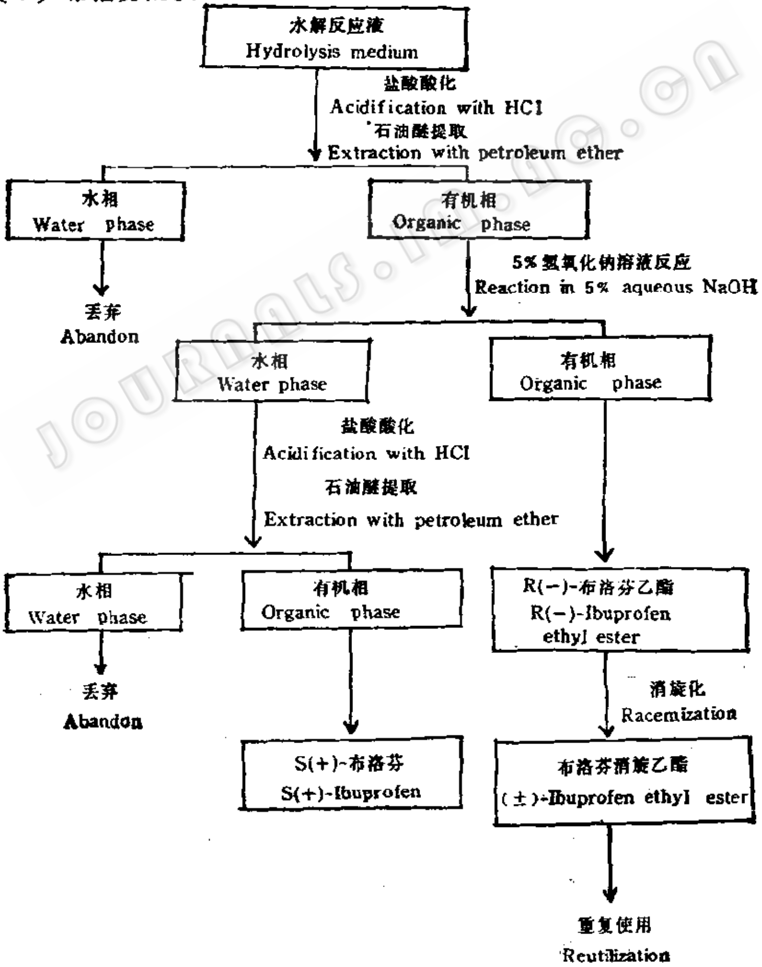

图 1 S(+)-布洛芬的提取分离程序

Fig. 1 Process for the separation of S(+)-ibuprofen

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.7 产物物理性质的测定

按上述提取程序得到产物 S(+)-布洛芬用 WRS-1 数字熔点仪(上海物理光学仪器厂)测定熔点,用 Perkin-Elmer 241 旋光仪(美国)测定比旋值,用 HPLC-CSP 方法测定 S(+)-布洛芬 ee(%)。

2 结果和讨论

2.1 不对称水解反应的底物的专一性

从试验五种布洛芬消旋酯(表 1) 看出, 皮状丝孢酵母 T158 具有较强的底物立体专一性。底物酯中醇基结构的微小改变就会引起水解酶活性和拆分专一性的较大改变。该酵母水解甲酯和异丙酯生成 S(+)-布洛芬 ee 均可达 97%;水解乙酯也可获得较高的拆分 (ee > 93%), 且水解活性明显高于甲酯和异丙酯; 而水解丙烯酯和氯乙酯的拆分专一性都稍差,前者水解活性也极低。下述试验均选择布洛芬乙酯为水解底物。

表 1　酵母 T158 的底物立体专一性

Table 1　Hydrolytic stereospecificity of substrate of Trichosporon cutaneum 158

布洛芬消旋酯 Ibuprofen racemic ester	布洛芬 Ibuprofen		S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee(%)
	C(g/L)	T(%)	
甲酯 Methyl ester	4.4	24.6	97.1
乙酯 Ethyl ester	5.07	30.1	93.6
异丙酯 iso-propyl ester	3.49	22.0	97.0
丙烯酯 Propylene ester	0.77	4.8	83.5
氯乙酯 Chloroethyl ester	3.38	23.0	86.3

2.2 底物浓度对拆分的影响

试验布洛芬乙酯浓度在 1.0—3.0%范围内对拆分的影响。在上述底物浓度内水解生成 S(+)-布洛芬ee值无明显区别,而布洛芬生成量随底物浓度提高而逐渐增加,但其增长率低于底物浓度的增长,导致转化率明显降低 (图 2)。

2.3 pH 对拆分的影响

将培养后的发酵液用盐酸或 NaOH 溶液调至 pH 4—9, 在不同 pH 条件下进行不对称水解反应 (图 3)。

从图 3 看出, 不对称水解 pH 在 6.5—7.0 之间最适。低于 pH 6.0 水解活性明显下降, pH > 8 可能因发生化学水解致使转化率略有回升而 ee 值下降。

2.4 温度对拆分的影响

将投料后菌液放置在不同温度的恒温摇床上进行不对称水解反应。试验三种温度, 即 28、33 和 37℃, 在上述温度范围内拆分能力无显著变化。

2.5 胞内酶的检定

将培养好的菌液经 3000r/min (5℃) 离心 15min, 收集酵母细胞, 用蒸馏水充分洗涤二次,每毫升菌液可得细胞湿重 75mg, 用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 按原体积配成不同浓度的细胞悬浮液。另将 7.5 g 湿细胞用丙酮冻融法[4] 制成干粉 0.8 g。取相应

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

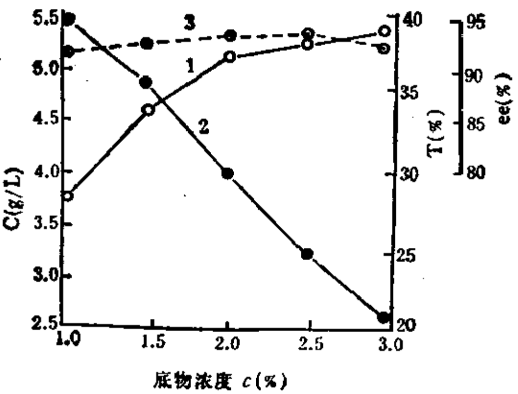

图 2 底物浓度对拆分的影响

Fig. 2 Effect of concentration of substrate on resolusion

1.布洛芬 Ibuprofen C; 2. 布洛芬 Ibuprofen T; 3. S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee

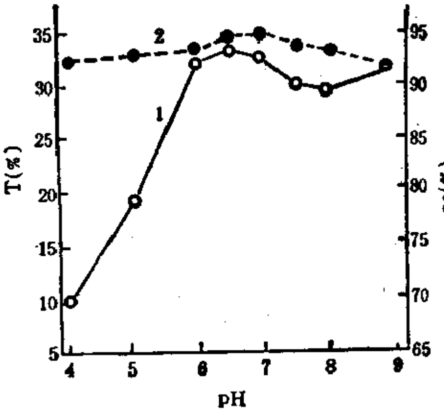

图 3 pH 对拆分的影响

Fig. 3 Effect of pH on resolusion

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

于上述细胞悬浮液量的干粉制成相同缓冲液悬浮体系。然后分别在原菌液、上清液、细胞和干粉悬浮液中投加 2%底物进行不对称水解反应。表 2 看出，原菌液离心后上清液几乎无水解活性，皮状丝孢酵母产生的水解酶主要存在于细胞内(胞内酶)。等量细胞的悬浮液与原菌液相比,转化率下降约 30%，ee 值也有所降低，该现象已证实为细胞悬浮液中表面活性剂的量减少所致。表中还可见,增加细胞或干粉浓度可显著提高水解活性。而细胞经冷冻丙酮处理后制成的干粉,不仅酶活完全保留,且抑制了细胞内非专一性酶的活性,使拆分专一性明显提高。

表 2 酵母 T158 产酶及拆分能力

Table 2 Enzyme formation and resolution Of *Trichosporon cutaneum* 158

水解部分 Election of hydrolysis (g/ml)		布洛芬 Ibuprofen T(%)	S(+)-布洛芬 S(+)-Ibuprofen ee(%)
上清液 Supernatant liquid		1.0	79.8
细胞悬浮液	0.075	22.2	90.5
Suspension	0.150	29.9	90.2
of cells	0.225	37.3	89.8
干粉悬浮液	0.008	23.8	95.6
Suspension of	0.016	30.1	96.3
powdered cells	0.024	37.6	95.4
原菌液 Normal liquid of cells		32.8	93.7

2.6 不对称水解反应的过程

在 12h 内水解速率迅速增长，36h 之后明显减慢，约 60h 以后基本趋于平衡。整个不

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

对称水解过程中，pH及 S(+)-布洛芬 ee 均无显著变化(图 4)。

2.7 产物提取和物理性质的测定

用 15 个 250ml 三角瓶，每瓶装 80ml 培养基；乙酯浓度 2%，投加底物总量 23g，水解 68h 经提取得到S(+)-布洛芬 5.50g，收率 27.2%；MP 48.4—49.5℃；$[\alpha]_D^{25}+55.0°$(C, 1; EtOH)(熔点，比旋值与文献[5, 6]报道一致) ee 93%，同时回收布洛芬乙酯 10.75g，$[\alpha]_D^{25}-26.6°$(C, 1; EtOH) 底物回收率 46.7%，其可经消旋化后重新使用。

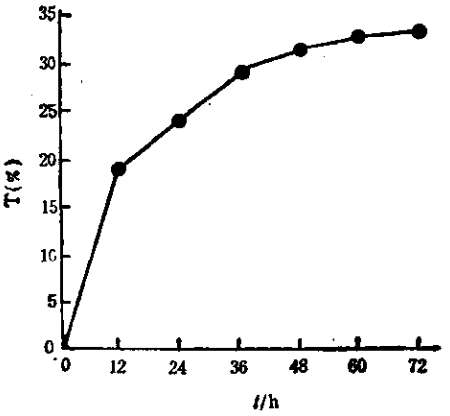

图 4　不对称水解的时间过程

Fig. 4　Time course of asymmetric hydrolysis

参考文献

[1] 徐诗伟，曹桂芳，徐　清，等. 微生物学报，1995，35: 190—196.
[2] 徐诗伟，徐　清，王维庆. 微生物学通报，1993，20: 311—313.
[3] 徐诗伟，徐　清，曹桂芳，等. 微生物学通报，1993，20: 371—374.
[4] 张树政主编. 酶学研究技术(上)，北京：科学出版社，1987. 8—9.
[5] Cesti P. Piccardi P. Eur Pat, 1986, 0195717.
[6] Matson S L. U S Pat. 1989, 4800162.

SYNTHESIS OF S(+)-2-(4-ISOBUTYLPHENYL) PROPIONIC ACID BY ASYMMETRIC HYDROLYSIS OF MICROBIAL ENZYME

II. REACTION CONDITIONS AND PRODUCT EXTRACTION

Xu Shiwei　Xu Qing　Cao Guifang　Wang Weiqing

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

Abstract *Trichosporon cutaneum* 158 exhibited higher sterospecificity to hydrolyze substrate ibuprofen ester. Among the five chosen substrate, asymmetric hydrolysis of methyl ester or isopropyl ester formed S(+)-ibuprofen of 97% ee. While ethyl ester not only gave ee 93% but also showed the highest hydrolytic activity. The optimum pH range for asymmetric hydrolysis was 6.5—7.0. Ability of resolusion was stabler in the range of temperature 28—37℃. This yeast produced intracellular enzyme. Hydrolysis can be carried out by powered cells treated by icedacetone to improve the specificity of resolution. The product S(+)-ibuprofen can be got with acid-base reaction and organic solvent extraction, unreacted esters can be recovered simutaneously.

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

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn