

# 酮基布洛芬拆分用酯酶产生菌的 筛选及其催化特性\*

沈 端 许建和\*\* 官鹏飞 刘幽燕 武慧渊

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘 要:** 从土壤中筛选获得一株可以高对映选择性水解酮基布洛芬乙酯的酵母 KET4, 经鉴定为芸苔丝孢酵母 (*Trichosporon brassicae*)。研究了该菌的生长和产酶过程, 考察了其静息细胞对酮基布洛芬乙酯水解的催化特性。用该菌催化酯水解时, 转化率为 41% 时, 产物的对映体过量值为 91%, 对映选择率达到 45。

**关键词:** 手性药物, 酮基布洛芬, 光学拆分, 芸苔丝孢酵母, 酯酶

**中图分类号:** Q93, Q55      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0045-05

---

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20176011)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20176011)

上海市青年科技启明星项目 (No. 98QB14042)

生物反应器工程国家重点实验室开放课题资助

\*\* 通讯作者 (biocat@online.sh.cn)

收稿日期: 2000-11-02, 修回日期: 2001-02-28

## ISOLATION OF AN ESTERASE PRODUCER *TRICHOSPORON* *BRASSICAE* AND ITS CATALYTIC PERFORMANCE IN KINETIC RESOLUTION OF KETOPROFEN

SHEN Duan XU Jian-He GONG Peng-Fei LIU You-Yan WU Hui-Yuan

(Laboratory of Applied Biocatalysis, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,  
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**Abstract:** A strain of yeast capable of hydrolyzing ethyl ester of racemic Ketoprofen with high enantioselectivity has been isolated from soil after two-step enrichment. The yeast was identified as *Trichosporon brassicae*. The process of growth and enzyme production was investigated. The catalytic performance of the resting cell of KET4 in kinetic resolution of Ketoprofen was also investigated. When the conversion of substrate reached 41%, enantiomeric excess of the (S) -Ketoprofen produced was 91%, indicating a high enantiomeric ratio of 45.

**Key words:** Chiral drug, Ketoprofen, Optical resolution, *Trichosporon brassicae*, Esterase

酮基布洛芬是一种 2-芳基丙酸类消炎药。药理研究发现, 该药的两种异构体中, 起消炎止痛作用的主要是 (S) -异构体, 而 (R) -异构体则可治疗牙周病的骨质疏松<sup>[1]</sup>。因此, 设法对外消旋酮洛芬进行光学拆分将具有显著的经济和社会效益。目前, 获得光学纯的酮洛芬比较成熟的方法主要有化学法<sup>[2,3]</sup>和酶法<sup>[4,5]</sup>, 其中酶法由于副反应少, 得率高, 产品易分离提纯等原因而倍受关注。而且微生物生长迅速, 培养条件简单, 因此直接利用产酶微生物更具吸引力。本文介绍一株酮洛芬拆分用酯酶产生菌的筛选和催化特性, 作为一种廉价、高效的催化剂, 将具有较好的工业应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

外消旋酮基布洛芬乙酯由本实验室参照文献方法<sup>[6]</sup>方法合成, 筛选所用土样分别从上海、南京、杭州等地采集。筛选培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/L, NaCl 0.5g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L, 酮洛芬乙酯 10mmol/L。发酵培养基: 蛋白胨 5g/L, 酵母膏 5g/L, 葡萄糖 10g/L。底物乳化液: 酮洛芬乙酯, 0.7mol/L, 吐温-80 50g/L。底物乙醇溶液: 100mmol 酮洛芬乙酯溶于 50mL 分析纯的乙醇。

### 1.2 菌种的筛选及分离

取 1g 新鲜土样加入 50mL 筛选培养基中, 以酮洛芬乙酯为唯一碳源经过两轮富集培养后, 稀释涂布于琼脂平板, 两轮筛选培养基中所加的底物分别为乳化液和乙醇溶液, 终浓度均为 10mmol/L。平板所得单菌落经纯培养后接入发酵培养基中, 充分生长后, 加入底物的乳化液至 10mmol/L 进行转化。一定时间后, 用等体积乙酸乙酯将产物和底物萃出。初筛以薄板层析分析, 保留可水解底物产生酮洛芬的菌。复筛的培养及转化条件与初筛相同, 用 HPLC 分析反应的转化率和产物的对映体过量值。

### 1.3 生长及产酶测定

在 5L 发酵罐中进行菌的生长及产酶测定, 发酵罐装液量 3L。发酵条件: 30℃, 搅拌转速 600r/min, 通气速率 0.3vvm。定时取样, 分别测定发酵液的 pH, 菌体浓度 ( $\text{OD}_{600}$ ), 葡萄糖浓度。另取 10mL 样品离心, 收集菌体并重悬浮于 2mL 含 10mmol/L 酮

洛芬乙酯和 0.5% (w/v) 吐温-80 的磷酸钾缓冲液 (50mmol/L, pH7.0) 中, 于 30℃, 120r/min 摇床上反应 1h 测定水解酶活力。一个酶活单位 (U) 定义为在所用实验条件下, 每分钟催化生成 1 $\mu$ mol 酮洛芬所需要的酶量。

所有实验数据均为 3 次平行实验的平均值, 图中标误差线为标准偏差。

## 1.4 分析方法

用 HPLC 法进行分析, 酮洛芬的生成量用 Lichrosorb RP-18 (200  $\times$   $\phi$ 5.0mm, 10 $\mu$ m) 柱测定, 流动相为甲醇: 水 (85:15, V/V), 流速 0.8mL/min; 产物的对映体过量值 (ee) 值用 Chiralcel OJ (250mm  $\times$   $\phi$ 4.6mm, Daicel, Japan) 柱测定, 流动相为正己烷: 异丙醇: 乙酸 (90:10:0.1, V/V/V), 流速 1.0mL/min。均采用 254nm 紫外检测。对映选择率 E 根据下式<sup>[7]</sup>计算:  $E = \ln [1 - x(1 + ee)] / \ln [1 - x(1 - ee)]$ , x 为反应的转化率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌的筛选

从各地共采集了 200 份土样, 以酮洛芬乙酯为唯一碳源进行了酯酶产生菌的筛选。

初筛采用两步富集法, 为避免假阳性菌利用吐温或乙醇为碳源进行生长所造成的误筛, 第一轮加入底物乳化液作为碳源, 第二轮则加入底物的乙醇溶液为碳源。初筛获得阳性菌 297 株, 复筛考察了它们对底物的水解活性及选择性。将水解转化率高于 5% 的 92 株菌分为高、中、低活性 (转化率分别为 >40%, 10~40%, 5~10%), 其中 8 株为高活性菌。

图 1 为这 92 株菌对底物的水解情况, 多数菌优先水解 (S)-构型的底物, 仅有 17 株对 (R)-构型的底物有优先选择性。综合考虑菌株的水解活力及光学选择性后, 选定了一株优先水解 (S)-构型底物, 高活性的菌 (图 1 中的实心点, 转化率为 51%, ee 值为 81%) KET4 作为拆分用的催化剂, 该菌由采自中国科学院上海有机所的土样中筛得, 经中国科学院微生物研究所鉴定为芸苔丝孢酵母 (*Trichosporon brassicae*), 其表现特征为液体培养有菌膜形成, 沉淀物絮状; 划线培养呈灰白色, 有皱纹, 鹅绒状, 质地坚韧, 边缘有菌丝形成。

随后的实验发现, 在相同测定条件下, 该菌的细胞悬液催化酮洛芬乙酯、对硝基苯酚丙酸酯等短链酯水解的活力可达 10U/L 以上, 而催化橄榄油、对硝基苯酚月桂酸酯等脂肪酶的特征底物时与空白无显著差异 (相对偏差小于 20%)。因此, 可以认为在 KET4 细胞中具有催化底物水解能力的活性成分为酯酶, 而非脂肪酶。

### 2.2 KET4 的生长及产酶过程

对 KET4 的生长及产酶情况进行了考察, 结果如图 2。在所给生长条件下, 接种 1h 后即进入对数生长期, 随后比生长速率基本维持在 0.34h<sup>-1</sup>直至第 10h。此时, 培养基中葡萄糖含量已低于 1g/L。此后由于糖基本耗尽, 生长趋于停止。对数生长期, 酮洛芬乙酯水解酶的活力随菌体的快速生长呈指数上升, 这表明该菌产酶可能是生长偶联型。从图 2 来看, 通过改善培养成分的供给或控制培养条件以延长对数生长期, 便可获得较大的菌体浓度从而使酶活水平得到提高。

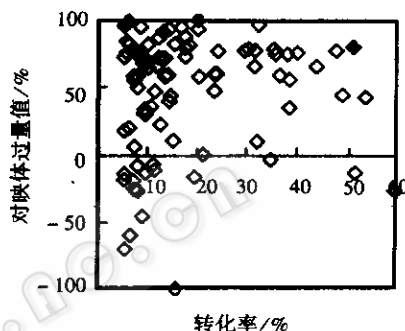


图 1 菌的复筛结果

产物的对映体过量值为正值的表示优先选择 (S)-构型, 反之则为优先选择 (R)-构型, 菌 KET4 标记为◆

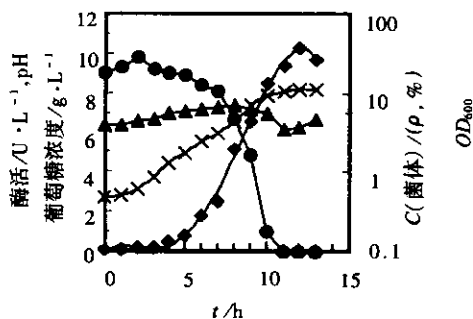


图 2 芸苔丝孢酵母 KET4 的生长及产酶曲线

—x— 菌体浓度 ( $OD_{600}$ ), —▲— pH,  
—●— 葡萄糖浓度, —◆— 酶活

酶活已低于 10%。由于较高反应温度易于使酮洛芬发生消旋, 综合考虑反应速度, 催化剂稳定性及产物的纯度要求, 确定以 35℃ 为水解反应的操作温度。

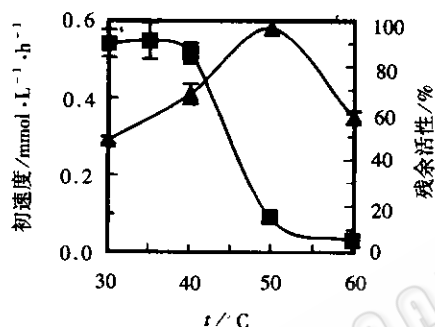


图 3 温度对静息细胞催化性能的影响

pH 7.0, 50mmol/L 磷酸钾缓冲液中测得, 反应时间均为 1h

—●— 水解反应初速度, —■— 残余酶活 (在相应温度下保存 12h 后测得, 以新鲜菌体的活力为 100%)

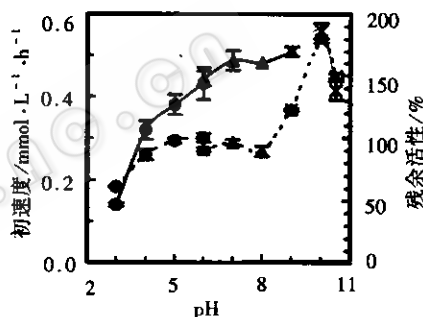


图 4 pH 对静息细胞催化性能的影响

30℃ 下反应 1h 测得, 实线为水解反应初速度, 虚线为残余酶活 (30℃, 70h, 新鲜菌体活力为 100%)

—●— 50mmol/L 柠檬酸缓冲液, —▲— 50mmol/L 磷酸钾缓冲液, —x— 50mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液

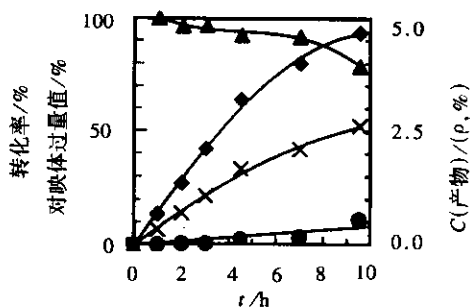


图 5 酮洛芬乙酯水解进程曲线

反应条件: 底物浓度 10mmol/L, 50mmol/L pH 7.0 磷酸钾缓冲液, 30℃, 120r/min

—x— 转化率, —▲— 产物的对映体过量值, —◆— 酮洛芬(S)-异构体浓度, —●— 酮洛芬(R)-异构体浓度

## 2.3 KET4 对酮洛芬乙酯的催化水解特性

收集对数生长末期的菌体, 制成静息细胞, 考察温度和 pH 对其催化性能的影响。

**2.3.1 温度的影响:** 在 pH 7.0 条件下考察了温度对静息细胞催化能力的影响, 结果如图 3。随着温度的提高, 反应初速度逐渐上升, 在 50℃ 时反应初速度达到最大, 温度继续上升至 60℃ 时, 反应速度显著下降。从热稳定性的变化来看, 菌体在 40℃ 下保存 12h 后, 残余酶活仍有原水平的 86%, 温度继续升高, 残余酶活即迅速下降, 60℃ 保存 12h 后残余酶活已低于 10%。

由于较高反应温度易于使酮洛芬发生消旋, 综合考虑反应速度, 催化剂稳定性及产物的纯度要求, 确定以 35℃ 为水解反应的操作温度。

**2.3.2 pH 的影响:** 研究了 pH 对静息细胞催化能力的影响, 结果见图 4。该图表明, KET4 的催化活力及其稳定性均在 pH 10.0 时达到最大值。值得注意的是, 静息细胞在弱碱性缓冲液 (pH > 8.0) 中, 30℃ 保存 70h 后, 其表观酶活比初始酶活有明显提高 (pH 10.0 放置 70h 后酶活是初始的 180%), 这可能是由于弱碱条件下, 细胞膜表面的脂质层被轻微水解从而改善了细胞的通透性所造成的。考虑到在碱性条件下进行长时间转化, 产物容易消旋, 因此水解反应操作 pH 取 8.0。

**2.3.3 酮基布洛芬乙酯水解反应进程:** 在上述

结果确定的反应条件下, 考察 KET4 静息细胞催化酮基布洛芬乙酯水解的进程曲线, 结果见图 5。水解过程中, 产物的对映体过量值一直保持较高水平, 转化率为 15% 时, ee

值大于 95%，直至转化率达 41% 时，*ee* 值仍有 91%，此时的对映选择率为 45，这一结果明显优于文献报导的用商品酶进行有机相反应的效果<sup>[8]</sup>。此后剩余的底物中 (S)-型异构体的浓度很低，(S)-型的水解反应速度降低，导致 *ee* 值随着反应的继续有所下降。因此，在实际应用中，控制反应的转化率在 40% 左右，对获较高光学纯度的 (S)-酮洛芬非常重要。

### 3 结论

本文通过筛选获得了一株芸苔丝孢酵母 KET4，能够立体选择性水解酮基布洛芬乙酯。该菌的产酶与生长相偶联。静息细胞催化的水解反应在 pH10.0 时反应速度最快，且细胞在弱碱性缓冲液中保存后表观酶活有提高。50℃ 下，反应速度达到最大，但温度超过 40℃ 时，稳定性迅速下降。最终确定的反应条件为 35℃，pH8.0。该菌具有较高的对映体选择活性，当转化率达到 41% 时，*ee* 值仍能达到 91%，对映选择率为 45。

### 参 考 文 献

- [1] Famaey J P, Paulus H E. *Therapeutic Applications of NSAIDs*. New York: Marcel Dekker, 1992.
- [2] Hiroyuki N, Shigeya S, Masafumi M, *et al.* *Eur Pat Appl EP 703212A1*, 1996.
- [3] 甘黎光. 中国新药杂志, 1997, 6 (4): 252 ~ 256.
- [4] Stinson S C. *Chemical & Engineering News*, 1995, 73 (1): 44.
- [5] Liu Y Y, Xu J H, Xu Q G, *et al.* *Biotechnol Lett*, 1999, 21 (2): 143 ~ 146.
- [6] Moreno J M, Sinisterra J V. *J Mol Catal*, 1995, 98: 171 ~ 179.
- [7] Chen C S, Fujimoto Y, Girdaukas G, *et al.* *J Am Chem Soc*, 1982, 104: 7294 ~ 7311.
- [8] 杜 伟, 宗敏华, 陈伟锋, 等. 微生物学通报, 2000, 27 (6): 429 ~ 432.