

# 微环境对脂肪酶催化酮基布洛芬立体选择性酯化的影响\*

杜伟<sup>1</sup> 宗敏华<sup>1</sup> 杨蓉<sup>1</sup> 李琼<sup>2</sup> 郭勇<sup>1</sup>

(华南理工大学生物工程系 广州 510640)<sup>1</sup> (华南理工大学现代化工技术重点实验室 广州 510640)<sup>2</sup>

**摘要:** 系统研究了反应介质、助溶剂、水活度、温度、pH等因素对脂肪酶 Novozym 435 催化酮基布洛芬动力学拆分的影响。以环己烷为反应介质,酶表现出较高的催化活性和对映体选择性;在环己烷中添加苯,可大幅度提高 E 值;适宜的反应温度为 30℃;最适反应初始水活度为 0.09;在所研究的 pH6~8 范围内,pH 对酶活及酶的对映体选择性影响不大。

**关键词:** 微环境, 脂肪酶, 酮基布洛芬, 立体选择性酯化

**中图分类号:** Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0352-05

## EFFECT OF MICROENVIRONMENT ON LIPASE-CATALYZED ENANTIOSELECTIVE ESTERIFICATION OF KETOPROFEN

DU Wei<sup>1</sup> ZONG Min-Hua<sup>1</sup> YANG Rong<sup>1</sup> LI Qiong<sup>2</sup> GUO Yong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Biotechnology department <sup>2</sup> Chemical Engineering Lab, South China

University of Technology, Guangzhou 510640)

**Abstract:** The effect of reaction media, cosolvent, water activity, temperature and pH on Novozym 435-catalyzed enantioselective esterification of ketoprofen was systematically explored. Novozym 435 showed high catalytic activity and enantioselectivity in cyclohexane; E value increases markedly by addition of toluene to cyclohexane; the optimum temperature and the initial water activity were found to be 30℃ and 0.09 respectively; pH shows little effect on enzymatic reaction within the scope studied.

**Key words:** Microenvironment, Lipase, Ketoprofen, Kinetic resolution

\* 广东省自然科学基金资助项目 (No.980543)

收稿日期: 1999-08-09, 修回日期: 1999-12-01

手性,是宇宙间的普遍特征,从原子到人类本身都是不对称的<sup>[1]</sup>。由于外消旋手性药物中各对映体具有不同的药理特性,因此,对外消旋手性药物进行拆分以得到光学纯的单一对映体就显得非常必要。非甾体消炎镇痛药物2-芳基丙酸(2-APA)类化合物(Naproxen, Ibuprofen, Ketoprofen),其 $\alpha$ -位有一个手性碳原子,存在一对光学异构体,其中,S-构型的具有生理活性,而R-构型的活性低或无活性。如S-Naproxen的活性为R-Naproxen的28倍;S-Ibuprofen的活性为R-Ibuprofen的160倍<sup>[2]</sup>。2-APA类药物历来用化学方法合成,一般总得到等量的一对对映体混合物(外消旋体),将其拆分是获得光学纯(S)-2-APA的主要方法。通常利用手性试剂将外消旋体混合物中一对对映体转化为两种非对映体,然后利用非对映体理化性质的差异将其分开,但此拆分过程较繁杂,且手性试剂昂贵,多数情况下难以得到满意的收率<sup>[3]</sup>。

酶作为一种特殊的催化剂,越来越受到人们的重视。非水相酶学和界面酶学的迅速发展,使不溶于水的手性药物亦能用酶法拆分。迄今,已有非水介质中酶法拆分Naproxen、Ibuprofen的报道,但利用脂肪酶促酯化反应拆分Ketoprofen的研究国内尚未见有报道。作者研究表明,脂肪酶Novozym 435能催化Ketoprofen立体选择性的酯化(另文报道)。本文系统研究反应介质、助溶剂、初始水活度、温度、pH等因素对脂肪酶Novozym 435催化Ketoprofen立体选择性酯化以拆分两对映体的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

脂肪酶Novozym 435,来源于*Candida antarctica*,固定化于大孔阴离子交换树脂,丹麦Novo公司赠送。

Ketoprofen,购自Sigma公司。其它化学试剂均为市售分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 有机溶剂脱水:将4A分子筛于180℃干

燥箱内活化2h,置干燥器中冷却后,加入有机溶剂中,室温振荡48h,滤去分子筛,得脱水有机溶剂。

1.2.2 反应初始水活度的控制:将冻干的脂肪酶Novozym 435与底物、脱水有机溶剂分别置于密闭容器中,与不同盐的饱和水溶液气相平衡72h,使酶及反应介质的水活度与盐溶液的水活度相同。22℃时,由饱和盐LiBr、MgCl<sub>2</sub>、Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NaCl、BaCl<sub>2</sub>水溶液平衡所得的初始水活度 $a_w$ 分别为:0.09、0.30、0.45、0.64和0.80<sup>[4]</sup>。

1.2.3 pH的控制:将脂肪酶溶于pH分别为6.0、6.5、7.0、8.0的磷酸盐缓冲液中,然后冻干得不同pH的脂肪酶。

1.2.4 脂肪酶促酯化反应:在50mL带塞三角瓶中装入预定量的反应底物和脱水有机溶剂,加酶开始反应,在30℃,50r/min振荡,取样0.1mL供液相色谱分析用。根据Ketoprofen的减少来计算反应的转化率及对映体选择性(%ee or E)。其他条件相同的不加酶对照实验表明,48h,转化率为0。

1.2.5 液相色谱分析:高效液相色谱仪:HP 1100(美国惠普公司),由华南理工大学现代化工技术重点实验室提供;手性柱:Sumichiral OA-2500(日本Sumika Chemical Analysis Service公司);检测器:紫外检测,波长为254nm;流动相:0.03mol/L乙酸铵甲醇溶液;流速:0.8ml/min;进样量:20 $\mu$ L。在该分析条件下,Ketoprofen对映体分离因子 $\alpha = 1.55$ 。

由于色谱操作条件稳定,且有自动控制进样装置,故本研究采用外标法。

转化率  $C\% = [1 - (A + B) / (A_0 + B_0)] \cdot 100$ ; 对映体过剩值  $\%ee = [(B - A) / (B + A)] \cdot 100$ ; 对映体选择性  $E = \ln[(1 - c)(1 - ee)] / \ln[(1 - c)(1 + ee)]$ ; 其中 $\%ee$ 为对映体过剩值; $A_0, B_0$ 分别为酶促反应前Ketoprofen两对映体的浓度(mmol/L);A, B表示为反应后残余Ketoprofen的对映体的浓度(mmol/L);E:表示酶对映体选择性的大小。E值越大,酶的对映体选择性越好;E值为1,表示酶无对映体选择

性<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应介质对脂肪酶促酮洛芬酯化反应的影响

有机溶剂的性质对酶的催化活性及对映体选择性有显著的影响<sup>[6]</sup>。一方面,溶剂直接影响酶的构象,从而影响酶的催化功能;另一方面,溶剂还通过改变底物及产物在酶分子表面的浓度影响整个反应,对有底物或产物抑制的反应尤为如此。此外,溶剂还可影响酶分子表面的水化层进而影响酶的催化特性。本研究考察了4种脱水有机溶剂对脂肪酶 Novozym 435 催化酮洛芬与丙醇酯化反应的影响,结果发现,酶的活性与 LogP 有着较好的关联性,符合溶剂疏水性模型(图1)。酶在极性很强的四氢呋喃中完全失活,这是由于与水互溶的强极性有机溶剂,“剥夺”了酶分子表面的水,酶得不到维持其活性构象所必需的水而失活。随着溶剂疏水性的

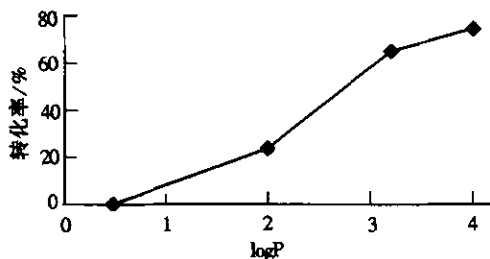


图1 溶剂的疏水性对酶促酯化反应的影响

条件: 6.7mmol/L 酮洛芬 + 13.4mmol/L 丙醇, 10mL 脱水有机溶剂, Novozym 435, 50mg, 30℃, 15h

提高,与酶分子结合的水增多,酶活提高,故酶催化酯化反应速度加快。但酶反应的对映体选择性随溶剂疏水性的增大而下降。这是因为在疏水性较大的有机溶剂中,酶的水化程度较高,因而酶分子结构有较大的“挠度”,其不只可与(R)-构型的 Ketoprofen“契合”,还可与(S)-构型的 Ketoprofen“契合”,故酶反应对映体选择性下降。因之,选择反应介质时要兼顾酶反应速度及酶对映体选择性。在本研究的范围内,

表1 溶剂对脂肪酶拆分酮洛芬的影响

溶剂	*LogP <sup>[4]</sup>	C (%, t/h)	ee %	C (%, t/h)	ee (%)
四氢呋喃	0.49	0 (50h)	0	0 (100h)	0
苯	2.0	55 (70h)	72	70 (98h)	89
环己烷	3.2	59 (6h)	46	72 (15h)	80
庚烷	4.0	64 (6h)	25	78 (15h)	76

条件: 6.7mmol/L 酮洛芬 + 13.4mmol/L 丙醇, 10mL 脱水有机溶剂, Novozym 435, 50mg, 30℃; \*LogP表示一种溶剂在辛醇/水两相之间的分配系数的常用对数值

以环己烷为反应介质较宜(表1)。

### 2.2 环己烷中添加极性助溶剂对酶促酯化反应的影响

Novozym 435 在疏水性较大的有机溶剂中催化 Ketoprofen 酯化反应的速度较快,但酶对映体选择性却较低。而在疏水性较低的极性溶剂中虽然反应速度较慢,但对映体选择性较高。因之,将疏水性较高与较低的溶剂混合作为反应介质有可能同时得到高催化活性和立体选择性。本研究表明,在环己烷中添加极性比环己烷大的有机助溶剂后,酶促酯化反应速度变慢,但酶反应对映体选择性却提高了。在 10mL 纯

环己烷反应体系中, E 值为 4.7, 当在 8mL 环己烷中添加 2mL 的苯, E 值升至 7.6; 然而即使添加少量的四氢呋喃, 酶活完全丧失。这是由于与水完全互溶的强极性溶剂完全剥夺掉维持酶分子构象的必需水, 导致酶失活; 极性有机溶剂的比例对酶促酯化反应有着显著影响(表2)。有机溶剂的添加有一个最适比例, 极性助溶剂的添加量越大, 酶促酯化速度越小, 但光学纯度增加。但过多的极性有机助溶剂不仅使酶活大大降低, 也会降低酶的立体选择性。在环己烷中(总体积为 10mL) 添加不同量的极性溶剂苯, 当苯添加量较少时, 随着苯的增多, 酶促酯化反

应速度变慢,但酶反应光学纯度逐渐升高。向反应体系中添加 5mL 苯, E 值升至 46.6。但继续加大苯的量时,酶反应对映体选择性却骤然下降。反应体系中加入 6mL 苯, E 值急剧下降到 20(其原因作者正在进一步研究中)。

表2 助溶剂的添加量对酶促酯化反应的影响

反应介质	C(%)	E
10mL环己烷	77	4.7
8mL环己烷+2mL苯	65	7.6
6mL环己烷+4mL苯	41	39
5mL环己烷+5mL苯	37	46.6
4mL环己烷+6mL苯	33	20

反应条件: 6.7mmol/L Ketoprofen+26.8mmol/L丙醇, Novozym 435, 50mg, 34℃, 28h

### 2.3 反应初始水活度对酶促酯化反应的影响

酶蛋白的水化作用是稳定酶催化活性构象的必要条件。在完全无水的条件下,酶不能发挥其催化作用。但体系中存在过量的水,会导致酶结块,增加反应阻力;过量的水分在酶分子表面形成水簇不仅影响传质,还会降低酶的立体选择性。这是由于随着水活度的增加,“束缚”在酶分子表层的水分增多,酶分子具有更大的“挠度”,即它不仅可与(R)-异构体“契合”,也可与(S)-异构体“契合”,故表现为酯化反应速度增加,而酶反应对映体选择性却降低了。另外,水是酯化反应的逆反应-酯水解反应的底物,过量水的存在将加速逆反应。因之,在本研究中控制适量的水就显得特别重要。初始水活度对脂肪酶 Novozym 435 催化 Ketoprofen 与丙醇间酯化反应的影响见图 2 及表 3。水活度较低时,随着水

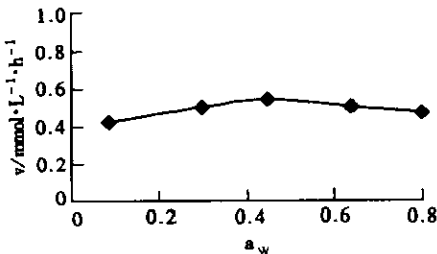


图2 初始水活度对酶促酯化反应速度的影响

活度的增大,酶促酯化反应速度加快。当水活度从 0.09 增加到 0.45 时,酯化反应速度从 0.42 mmol/L · h<sup>-1</sup> 升到 0.52 mmol/L · h<sup>-1</sup>。但水活度

超过 0.45 后酯化反应速度随水活度的进一步提高而下降。在所研究的水活度范围内,酶的对映体选择性随水活度的增加而降低。在所研究的范围内,最适初始水活度为 0.09。

表3 初始水活度对酶反应对映体选择性的影响

$a_w$	C(%, t/h)	ee(%)
0.09	66(25h)	91
0.30	67(25h)	87
0.45	72(20h)	85
0.64	69(20h)	82
0.80	63(20h)	80

反应条件: 9.6mmol/L Ketoprofen+38.4mmol/L丙醇, 7mL环己烷, Novozym 435, 50mg, 30℃

### 2.4 反应温度对酶促酯化反应的影响

温度对酶的催化活性及对映体选择性有着显著影响。在本研究范围内,Novozym 435 催化 Ketoprofen 酯化反应速度随着反应温度的升高而加快;但酶反应的立体选择性却随温度的升高而降低(图 3)。转化率为 53% 时, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃ 的酯化反应时间分别为 12h, 9h, 3h, 1h; 对映体过剩值分别为 68%, 60%, 57%, 50%(在实际操作中难以控制,作者通过时间 t-转化率 C% 作图,从图上得出相同转化率下对应的酯化反应时间)。故在本研究范围内,30℃ 为最佳反应温度。

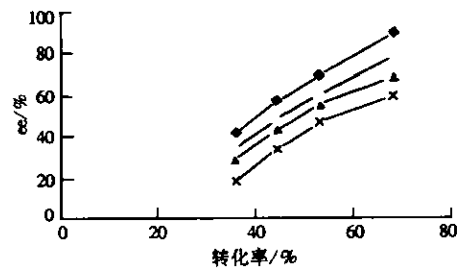


图3 温度对酶促酯化反应的影响

反应条件: 6.7mmol/L ketoprofen+26.8mmol/L丙醇, 10L 除水环己烷Novozym 435, 50mg; 其中: 系列1 30℃, 系列2 40℃, 系列3 50℃, 系列4 60℃

—◆— 系列1, —■— 系列2, —▲— 系列3, —×— 系列4

### 2.5 pH 对酶促酯化反应的影响

有机介质中的酶具有“刚性”结构,正是由于这种“刚性”结构使酶能够“记住”它最后存在过的水溶液的 pH 值<sup>[7]</sup>。冻干脂肪酶 Novozym 435 催化 Ketoprofen 与丙醇的酯化反应结果为: 在所

研究的 pH 范围内, pH 对酶的催化活性及酶反应对映体选择性影响不大。这可能是由于 pH 的变化范围不大, 酶构象受到的影响较小。pH 为 6.5 时, 酶表现出较高的对映体选择性(表 4)。

表4 pH对脂肪酶催化Ketoprofen酯化反应的影响

pH	C(%)	E
6.0	72	4.8
6.5	70	5.1
7.0	71	4.1
7.5	71	3.8
8.0	69	3.8

反应条件: 6.7mmol/L ketoprofen+26.8mmol/L丙醇,  
10mL除水环己烷, Novozym 435, 50mg, 34℃, 25h

反应介质、助溶剂、水活度、温度、pH 等因素对脂肪酶 Novozym 435 催化酮基布洛芬动力学拆分有着较大影响; 以环己烷为反应介质, 酶表现出较高的催化活性和对映体选择性; 在

环己烷中添加苯, 可大幅度提高 E 值; 适宜的反应温度为 30℃; 最适反应初始水活度为 0.09; 在所研究的 pH 范围内, pH 对酶活及酶的对映体选择性影响不大。

## 参 考 文 献

- [1] 戴立信, 陆熙炎, 朱光美. 化学通报, 1995, 6: 16~20.
- [2] Trani M, Ducret A, Pepin P, *et al.* Biotechnology letters, 1995, 17(10):1095~1098.
- [3] 徐诗伟, 徐清. 中国医药工业杂志, 1995, 26(1): 38~42.
- [4] Amelie D, Trani M, Robert L. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22:212~216.
- [5] Chen C S, Yoshinori F, Garg G. J. Am. Chem. Soc, 1982, 104:7294~7299.
- [6] Shubhada S, Sundaram P V. Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17:330~335.
- [7] Francesco S, Roberts P. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19:487~492.