

# 混合溶剂系统对脂肪酶酯化活性和选择性的影响\*

许建和 刘军民 许学书 袁勤生

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**关键词** 酮基布洛芬, 对映选择性酯化, 脂肪酶, 混合溶剂系统

**分类号** Q555 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0267-69

目前非水介质中的酶促反应主要局限于单一有机溶剂系统。为使非水相酶反应顺利进行, 所用反应介质一般必须满足 2 个条件: (1) 具有较高的疏水性 ( $\text{LogP}$  值)<sup>[1]</sup>; (2) 易于溶解底物。然而对于一些 2-芳基丙酸 (如酮基布洛芬, 以下简称酮洛芬) 的酶促酯化反应<sup>[2,3]</sup>,  $\text{LogP}$  值较高的有机溶剂 (如正己烷、环己烷、异辛烷等) 却很难溶解底物; 另一方面, 一些疏水性较弱的溶剂, 如苯、甲苯、氯仿等, 虽能溶解 2-芳基丙酸, 但酶在其中的活性却很低。因此, 本文在脂肪酶催化酮洛芬的对映选择性酯化反应中尝试使用了由一种主溶剂 (如异辛烷) 和一种助溶剂 (如甲苯) 组成的混合有机溶剂系统, 结果发现酶的活性显著高于单一溶剂系统, 同时酶的对映选择性随甲苯含量的变化发生了逆转, 产物酮洛芬酯的比旋光度由异辛烷中的正值 (S-对映体过量) 变为甲苯中的负值 (R-对映体过量)。

## 1 材料和方法

### 1.1 脂肪酶 (Lipase OF)

来源于圆柱形假丝酵母 (*Candida cylindracea*), 日本 Meito Sangyo 公司产品; 外消旋酮洛芬由西南合成药业公司提供, 化学含量高于 98%。丙醇、甲苯和异辛烷等试剂, 在使用前用分子筛脱除残留水分。

### 1.2 脂肪酶的固定化及非水相酶促酯化反应

将脂肪酶 (Lipase OF) 200 mg 与 0.2 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (0.1 mol/L, pH7.0) 缓冲液搅匀后加入硅藻土 250 mg, 仔细调和均匀。将此酶与反应混合物 (酮洛芬 50 mmol/L、正丙醇 50 mmol/L、混合溶剂 10 mL) 一起加入容量瓶中, 密闭后置于恒温 (40°C, 200r/min) 上反应。

### 1.3 反应转化率及产物比旋光度的测定

取少量反应液, 在 GF 硅胶薄板上定量点样 10 $\mu\text{L}$ , 用正己烷-乙酸乙酯-乙酸 (8:2:0.2) 展开后, 小心将含酯的硅胶刮下, 溶于乙醇在 255nm 处测定吸光度 (重复 2~3 次取平均值), 对照标准曲线可知酯的浓度, 进而计算反应转化率。停止反应后将酶滤出, 蒸去溶剂后用硅胶柱层析 (洗脱剂同薄板层析) 使酯与酸分离, 所得酯 (经 HPLC 检验为单峰) 以乙醇作溶剂测定比旋光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 以甲苯为助溶剂的混合溶剂系统中主溶剂对酶酯化活性的影响

首先以甲苯为助溶剂 ( $\phi$ 10%), 考察了疏水性 ( $\text{LogP}$  值)<sup>[1]</sup> 不同的有机溶剂, 如异辛烷 (4.7)、正己烷 (3.5)、环己烷 (3.0)、四氯化碳 (3.0)、甲苯 (2.5)、异丙醚 (1.9) 与乙酸乙酯 (0.68) 为主溶剂 ( $\phi$ 90%) 时, 固定化酶催化酮洛芬酯化的进程曲线。由图 1 可见, 在主溶剂疏水性较强 ( $\text{LogP} \geq 3.0$ ) 的系统中脂肪酶的

\* 国家自然科学基金项目 (No. 29506043), 同时得到国家教委留学回国人员基金资助。

收稿日期: 1998-02-10, 修回日期: 1998-11-26。

酯化活性较高,因为这些溶剂不易夺取酶分子的“必需水”<sup>[4]</sup>。而酶在环己烷( $\log P=3.0$ )中的活性反比异辛烷(4.7)中高的原因可能与底物在环己烷中的溶解度较高有关。但是酶在一些能完全溶解底物的溶剂系统(例如甲苯,甲苯+异丙醚,甲苯+乙酸乙酯)中的活性却非常地低。这说明一个好的溶剂系统必须同时兼顾到对底物的溶解作用和对酶的稳定作用;而混合溶剂系统比单一有机溶剂能更好地满足这两方面的要求。由于在异辛烷中所得酯的比旋光度最高,因而最终选定异辛烷为最佳的主体溶剂。

## 2.2 以异辛烷为主溶剂混合溶剂系统中助溶剂对脂肪酶活性的影响

考察了甲苯、苯、氯仿及乙酸乙酯分别为助溶剂时,混合溶剂系统对酶酯化活性的影响。由图2可见,在甲苯( $\log P2.5$ )为助溶剂的混合溶剂中脂肪酶的催化活性最高,其次为苯( $\log P2.0$ )、氯仿( $\log P2.0$ )与乙酸乙酯( $\log P0.68$ )。值得注意的是,由于助溶剂的  $\log P$  值和所占的体积百分比都相对较小,因此异辛烷作主溶剂时,各混合溶剂系统的总体  $\log P$  值( $= X_a \times \log P(a) + X_b \times \log P(b)$ ,  $X_a$  和  $X_b$  分别为组分  $a$  和  $b$  的摩尔分数)相差无几。然而酶的酯化活性却因助溶剂不同而差异很大。要解释这一现象,除了考虑不同助溶剂之间物理性质(如  $\log P$  值)的差异之外,极性较强的助溶剂与蛋白质之间直接的相互作用,导致酶分子构象的改变,可能也是酶活性随助溶剂不同而显著变化的一个重要原因。

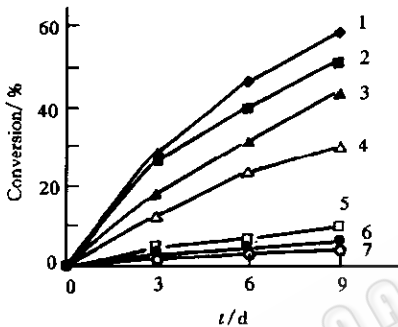


图1 固定化脂肪酶催化酮洛芬酯化的进程曲线  
Composed of  $\phi 10\%$  toluene as a cosolvent and  $\phi 90\%$  of different main solvents: 1. Cyclohexane; 2. Isocetane; 3.  $n$ -hexane; 4. Carbon tetrachloride; 5. Toluene; 6. Isopropyl ether; 7. Ethyl acetate

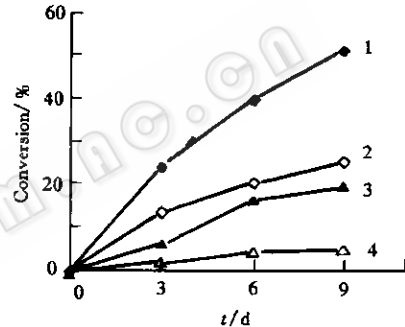


图2 混合溶剂系统中固定化脂肪酶催化酮洛芬酯化的进程曲线  
Composed of  $\phi 90\%$  isocetane as main solvent and  $\phi 10\%$  different cosolvents: 1. Toluene; 2. Benzene; 3. Chloroform; 4. Ethyl acetate

## 2.3 助溶剂含量对脂肪酶酯化活性的影响

在异辛烷-甲苯系统中,助溶剂甲苯的含量对脂肪酶催化酮洛芬酯化反应的影响如图3所示。该图清楚地表明酶在纯异辛烷( $\log P4.7$ )中的活力要比在纯甲苯( $\log P2.5$ )中高得多,这与所谓的  $\log P$  规则<sup>[1]</sup>是一致的。但是当向异辛烷系统中引入极少量助溶剂甲苯时,酶促酯化反应的速度非但没有下降,反而显著加快,并且在甲苯加入量为2%时达到最大值,与不加甲苯时相比提高了40%。这一现象一方面可归因于甲苯对酮洛芬的增溶作用,因为底物酮洛芬在纯异辛烷中溶解度很低,严重影响了酯化反应的速度;另一方面,少量(2%)甲苯的加入可能也会导致激活。但当甲苯浓度继续增加(超过10%)时,则过分影响了酶的结构而使酶失活,抵消了对底物的增溶效应,从而导致酶反应速度显著下降。

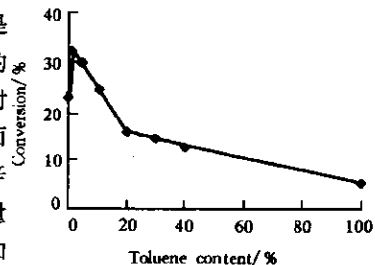


图3 甲苯含量对酮洛芬酯化反应转化率的影响

## 2.4 助溶剂含量对脂肪酶对映选择性的影响

为考察异辛烷-甲苯系统中甲苯含量对酶对映选择性的影响规律,我们适当加大了酶反应的批量(见表1脚注),反应后通过柱层析获得了纯的酮洛芬丙酯(在HPLC上为单峰),并测定了酯的比旋光度( $[\alpha]_D$ )。由表1可见,加入2%的甲苯作为助溶剂不仅可显著加快反应速度,而能增强酶的对映选择性,从而提高产物的光学纯度。但甲苯含量超过2%时,酮洛芬酯的比旋光度随甲苯的增加而显著下降,表明过量的甲苯无论对酶的活性还是对酶的选择性都是不利的。特别有趣的是,当甲苯的含量继续增加到某一临界值(约70%)时,脂肪酶的立体选择性发生了逆转,酮洛芬酯的旋光方向由正变为负,由异辛烷中的优先选择(S)-酮洛芬变为在甲苯中的优先选择(R)-酮洛芬。这一结果表明通过溶剂工程(Solvent engineering)的方法,可人为地调节控制某一酶的专一性是完全可能的<sup>[5]</sup>。

表1 混合溶剂系统中甲苯含量对酮洛芬酯化对映选择性的影响

Toluene content/ $\phi\%$	Reaction time/h	Conversion /%	$[\alpha]_D$ of ester (c1~2 in EtOH)
0	72	18.6	+41.6
2	72	25.2	+44.2
10	72	30.3	+44.2
50	144	28.8	+9.5
100	144	16.1	-20.2

Reaction conditions: Lipase OF 1.00 g adsorbed on celite, Ketoprofen 50 mmol/L, *n*-propanol 50 mmol/L, mixed solvent 100 mL; 30°C, 200 r/min.

## 参 考 文 献

- [1] C. Laane, S. Boeren, K. Vos *et al.* *Biotechnol. Bioeng.*, 1986, **30**:81~87.
- [2] M. Arroyo, J. V. Sinisterra. *J. Org. Chem.*, 1994, **59**:4410~4417.
- [3] J. M. Moreno, J. V. Sinisterra. *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 1995, **98**:171~184.
- [4] A. Zaks, A. M. Klibanov. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**:3194~3201.
- [5] T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russell *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**:7236~7237.

## Effect of Mixed Solvent System on Esterification Activity and Selectivity of Lipase\*

Xu Jianhe Liu Junmin Xu Xueshu Yuan Qinsheng

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

**Abstract** Lipase-catalyzed enantioselective esterification of (R, S)-Ketoprofen(2-(3-benzoylphenyl) propionic acid) with *n*-propanol was carried out in a mixed solvent system composed of one hydrophobic solvent as a bulk medium and one substrate-dissolving component as a co-solvent. Effects of the bulk solvents and cosolvents and the ratio of volume on activity and enantioselectivity of the enzyme(Lipase OF) were systematically investigated. As a result, isooctane was selected as the best bulk solvent and toluene as the best cosolvent. In the mixed solvent system of isooctane-toluene, the esterification activity of lipase was obviously higher than that in the single solvent system of either isooctane or toluene, with an maximum obtained at 2% of toluene. The enantioselectivity of lipase in the mixed solvent system was also shown to be remarkably dependent on the content of cosolvent, with an maximum optical rotation of ketoprofen ester ( $[\alpha]_D + 44.2^\circ$ ) occurred again at 2% (v/v) of toluene, and interestingly, a minus value ( $-20.2^\circ$ ) observed at 100% of toluene.

**Key words** Ketoprofen, enantioselective esterification, lipase, mixed solvent system

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 29506043).