

研究报告

高选择性不对称还原 *N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺的 重组氧化还原酶催化性质及其酶促转化

李斌¹ 聂尧^{1*} 徐岩^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学食品生物技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】通过表达多种重组立体选择性氧化还原酶,分析其催化不对称还原 *N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DKTP)的性质,从而构建酶促合成(*S*)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DHTP)的反应体系。【方法】基于已有立体选择性氧化还原酶重组大肠杆菌,通过 Ni 离子亲和层析法纯化得到重组氧化还原酶,以 DKTP 为底物,考察不同重组氧化还原酶对 DKTP 的催化活性和选择性,进一步对高选择性酶促合成(*S*)-DHTP 的重组酶 CR2 进行性质分析,并考察其在最适条件下不对称还原 DKTP 的过程。【结果】筛选获得产物构型为(*S*)-型的催化活性最高的酶为 CR2,该酶米氏常数 K_m 为 0.135 mmol/L, k_{cat}/K_m 为 3.689 L/(mmol·s),最适 pH 8.4 (0.1 mol/L 三乙醇胺缓冲液),最适反应温度为 35 °C,在 10-45 °C 条件下和 pH 7.5-8.5 较为稳定, Zn^{2+} 离子对酶活有促进作用。CR2 催化 DKTP 不对称还原反应 6 h 后, DHTP 的产率达 92.1%、光学纯度达 99.9%。【结论】基于活性和选择性分析,获得不对称还原 DKTP 的目标酶 CR2,其催化特性有利于高立体选择性还原 DKTP 生成度洛西汀中间体(*S*)-DHTP,从而为进一步提高酶促不对称还原 DKTP 的转化效率提供研究基础。

关键词: 氧化还原酶, 生物催化, 不对称还原, (*S*)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺, 酶学特性

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21376107, 21336009); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20151124); 111 Project (No. 111-2-06); Program for Advanced Talents within Six Industries of Jiangsu Province (No. 2015-NY-007); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

*Corresponding author: Tel: 86-510-85197760; E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

Received: March 09, 2016; Accepted: April 29, 2016; Published online (www.cnki.net): June 07, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376107, 21336009); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20151124); 高等学校学科创新引智计划项目(111 计划, No. 111-2-06); 江苏省六大人才高峰计划项目(No. 2015-NY-007); 江苏高校优势学科建设工程项目

*通讯作者: Tel: 86-510-85197760; E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-03-09; 接受日期: 2016-04-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-07

Characterization of highly stereoselective oxidoreductase for asymmetric reduction of *N,N*-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine

LI Bin¹ NIE Yao^{1*} XU Yan^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To construct a biocatalytic system for enzymatic synthesis of (*S*)-*N,N*-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine (DHTP), several stereoselective oxidoreductases were expressed from recombinant strains and explored on their properties of catalyzing asymmetric reduction toward *N,N*-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine (DKTP). [Methods] From available recombinant strains involving oxidoreductases, enzymes were purified by Ni-ion affinity chromatography and their catalytic activities and stereoselectivities were evaluated toward DKTP. Among them, CR2 was further characterized, which could catalyze highly stereospecific synthesis of (*S*)-DHTP. Then, the catalytic process of CR2 was studied for asymmetric reduction of DKTP under optimal conditions. [Results] Enzyme CR2 was obtained with high stereoselectivity and catalytic activity for (*S*)-DHTP production. Its kinetic parameters of K_m and k_{cat}/K_m were determined as 0.135 mmol/L and 3.689 L/(mmol·s), respectively. For CR2, the optimal pH was pH 8.4 (0.1 mol/L triethanolamine buffer) and the optimal reaction temperature was 35 °C. It was more stable at the temperatures ranging from 10 °C to 45 °C and at the pH ranging from 7.5 to 8.5. Zn^{2+} improved the enzyme activity of CR2. When the reaction was carried out for about 6 h, the target product was achieved with the yield of 92.1% and the optical purity of 99.9%. [Conclusion] This work provides the research foundation for further improvement of the enzymatic conversion efficiency of asymmetric reduction of DKTP.

Keywords: Oxidoreductase, Biocatalysis, Asymmetric reduction, (*S*)-*N,N*-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine, Enzymatic characteristics

氧化还原酶具有高度的化学选择性 (Chemoselectivity)、区域选择性 (Regionselectivity) 和对应选择性 (Enantioselectivity), 催化氧化还原过程需要辅酶的参与, 特别适合用来催化不对称反应, 得到重要的手性化合物, 用作工业应用中重要的手性砌块^[1]。

度洛西汀, 英文名 (*R*)-Duloxetine, 化学名 (*S*)-*N*-甲基-3-(1-萘氧基)-3-(2-噻吩基)-1-丙胺, 商品名欣百达, 是一种 5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取的双重抑制剂 (SNRIs)^[2]。临床上应用其盐酸盐治疗抑郁症、压力性尿失禁、抑郁症伴发慢性疼痛、糖尿病周围神经病性疼痛^[3]。度洛西汀的两种化学组成相同的同分对映异构体中, 只有 (*S*)-型具有上述药理活性^[4]。目前有很多不对称合成手性度洛西汀的方

法^[5]。通过逆合成分析可以发现, (*S*)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺 (DHTP) 是制备度洛西汀的一种重要手性中间体, *N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺 (DKTP) 可以被不对称还原生成 (*S*)-DHTP, 因而通过 (*S*)-专一性不对称还原 DKTP 已经成为高效制备度洛西汀的一种重要方法^[2]。

生物法制备手性醇具有高效、专一、立体选择性好、反应条件温和等优点, 已经成为制备手性醇的重要手段^[6-9]。目前, 已经筛选得到多株能够不对称还原 DKTP 制备度洛西汀中间体 (*S*)-DHTP 的微生物, 例如 *Exiguobacterium* sp., *Thermoanaerobacter* sp., *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. viswanathii*, *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429 等^[10-15]。其中 *C. tropicalis*、*C. viswanathii* 催化 1 g/L DKTP 不

对称生成(*S*)-DHTP 时, 转化率为 80%左右、对映体过量值>99%, 但是反应时间长达 60 h, 效率低下, 大大限制了其工业应用^[12-13,16]。目前国内度洛西汀手性中间体的研究较少, 且水平较低^[15,17]。因此, 有必要寻找高选择性的氧化还原酶, 以实现 DKTP 不对称生成(*S*)-DHTP 的高效生物反应制备。

本研究从研究室已有的多株立体选择性氧化还原酶重组大肠杆菌出发, 通过 Ni 离子亲和层析法纯化得到重组氧化还原酶, 以 DKTP 为底物, 考察不同重组氧化还原酶对 DKTP 的催化活性和选择性, 进一步对高选择性酶促合成(*S*)-DHTP 的重组酶 CR2 进行性质分析, 并考察其在最适条件下不对称还原 DKTP 的过程。

1 材料与方法

1.1 菌株

E. coli BL21/pET21c-*adhr*、*E. coli* BL21/pET21c-*cl*、*E. coli* BL21/pET21c-*c2*、*E. coli* BL21/pET21c-*cr2*、*E. coli* BL21/pET21c-*cr4*、*E. coli* BL21/pET21c-*krd*、*E. coli* BL21/pET21c-*oye*、*E. coli* BL21/pET21c-*rcr*、*E. coli* BL21/pET21c-*s1*、*E. coli* BL21/pET21c-*scr*、*E. coli* BL21/pET21c-*scr1*、*E. coli* BL21/pET21c-*scr3* 由江南大学酿造微生物学及应用酶学研究室保藏。

1.2 主要试剂及仪器

N,N-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DKTP)、(*S*)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DHTP)、(*R,S*)-DHTP 均购自百灵威科技有限公司; 氨基青霉素、IPTG、辅酶 NAD(P)H、NAD(P)⁺均购自上海生工生物技术有限公司; 正己烷(色谱纯)、异丙醇(色谱纯)购于 Damas-beta 公司; 其他分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

主要仪器: 酶标仪购自 Thermo 公司; pH 计购自 Mettler Toledo 公司; 高效液相色谱仪 Agilent 1200 购自美国 Agilent 公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0, 固体培养基加入 20.0 g/L 琼脂。

培养基的灭菌条件: 1×10^5 Pa, 灭菌 30 min。

1.4 氧化还原酶的诱导表达及分离纯化

挑取氧化还原酶重组菌单菌落接种到含 80 mg/L 氨基青霉素的 4 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 并以 2%的接种量转接到含 80 mg/L 氨基青霉素的 100 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 向培养基中加入 0.1 mmol/L IPTG, 17 °C、200 r/min 诱导表达 12 h。

将诱导表达后的发酵液离心, 收集菌体并用生理盐水洗涤 3 次, 重悬于 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0) 高压匀浆破碎。4 °C 条件下 12 000 r/min 离心收集上清液并用 0.22 μ m 滤膜过滤, 即为粗酶液。采用 Ni 离子亲和层析法对重组氧化还原酶进行分离纯化: 在 4 °C 条件下, 先后用 20 mL 20%乙醇、40 mL 超纯水冲洗柱子, 再用 20 mL 的 Binding buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 平衡柱子, 平衡完成后将粗酶液缓慢加入柱中, 先后用 10 mL Binding buffer、10 mL 60 mmol/L 咪唑(20 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, 60 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 洗去亲和力较弱的杂蛋白, 最后加入 Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 进行洗脱, 得到目标蛋白液。目标蛋白液经过超滤浓缩后, 参照 PD-10 Desalting column 脱盐柱进行目标蛋白溶液的脱盐, 所得蛋白酶液经 SDS-PAGE 检验其纯度^[18]。

1.5 重组氧化还原酶活性及酶学性质检测

重组酶酶活测定体系: 100 μ L 体系中含 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 0.5 mmol/L NAD(P)H, 5 mmol/L 底物, 30 °C 恒温 3 min, 最后加入适量纯酶液混合均匀后, 开始扫描 340 nm 处的吸光值变化。重组酶活性测定实验重复 3 次, 取平均值。

1 个酶活单位(U)是指每分钟催化氧化 1 μ mol 辅酶 NAD(P)H 的酶量。

蛋白含量的测定: 用 Thermo Scientific

Nanodrop 8000 型检测器检测 280 nm 处的吸光值 E ，目标蛋白浓度根据摩尔消光系数换算得到，即蛋白浓度(g/L)= E /摩尔消光系数，重组酶的摩尔消光系数通过在线网站 <http://www.expasy.org/> 预测获得。比活计算公式：比活(U/mg)=酶活(U)/蛋白量(mg)。

测定重氧化还原酶的动力学参数时，测定体系为 100 μ L 体系中含 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)，辅酶 NAD(P)H 0.5 mmol/L，底物(0.05–0.4 mmol/L)和适量的纯酶液。动力学性质研究实验重复 3 次取平均值，并利用 Lineweaver-Burk 作图法获得重组酶的动力学参数。

分别在不同 pH 梯度(6.0–9.0)和不同温度梯度(20–80 $^{\circ}$ C)下测定重组氧化酶的酶活，以确定重组氧化酶的最适 pH、最适温度。

将纯化得到的重组氧化还原酶分别置于不同温度(15–70 $^{\circ}$ C)处理 12 h，测定其温度稳定性。将重组氧化还原酶在 4 $^{\circ}$ C 分别置于不同 pH 梯度(6.0–9.0)处理 12 h，测定其酸碱耐受性。

在反应体系中添加终浓度 1 mmol/L 的金属离子螯合剂 EDTA(Na)₂，考察其对酶催化活性的影响。随后，在金属离子螯合剂 EDTA(Na)₂ 处理后的酶液体系中添加不同种类的金属离子(终浓度 1 mmol/L CaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、FeCl₃、MgSO₄、MnCl₂、NiSO₄、ZnSO₄)，考察不同金属离子对酶催化活性的影响。

1.6 重组氧化还原酶对 DKTP 的不对称转化

反应体系为 2 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中含有 5 mmol/L DKTP、等摩尔的辅酶 NAD(P)H 和适量酶液于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 反应 8 h。反应结束后，加入 2 倍体积乙酸乙酯萃取，有机相用于高效液相色谱仪分析产物光学纯度及产率，本文中的生物转化实验均重复 3 次取平均值。

在最适反应 pH、最适反应温度下，将纯化所得的氧化还原酶与 1 g/L 底物反应不同时间，测定其底物催化反应特性。

1.7 HPLC 检测条件

产物检测均在 Agilent 1200 型液相色谱仪上进行。

DKHP 的检测条件：Chiralcel OD-H 柱(250 mm \times 4.6 mm)，紫外检测波长 241 nm，流动相为正己烷:异丙醇(98:2, 体积比)，流速 0.8 mL/min。出峰时间：(R)-DHTP 16.4 min、(S)-DHTP 18.3 min。

2 结果与分析

2.1 重组氧化还原酶的表达及纯化

将 12 株重组氧化还原酶菌株 *E. coli* BL21/pET21c-*adhr*、*E. coli* BL21/pET21c-*c1*、*E. coli* BL21/pET21c-*c2*、*E. coli* BL21/pET21c-*cr2*、*E. coli* BL21/pET21c-*cr4*、*E. coli* BL21/pET21c-*krd*、*E. coli* BL21/pET21c-*oye*、*E. coli* BL21/pET21c-*rcr*、*E. coli* BL21/pET21c-*s1*、*E. coli* BL21/pET21c-*scr*、*E. coli* BL21/pET21c-*scr1*、*E. coli* BL21/pET21c-*scr3* 的种子液转接到含氨苄抗性的 LB 液体培养基中培养，并用 IPTG 进行诱导，将收集的菌体重悬于 Tris-HCl 缓冲液中，高压匀浆破碎、离心、过膜得到粗酶液。然后用 Ni 离子亲和层析法对各重组氧化还原酶进行分离纯化，经 SDS-PAGE 检验，各重组氧化还原酶条带和理论值一致，如图 1 所示。纯化蛋白用于下一步的酶学特性分析。

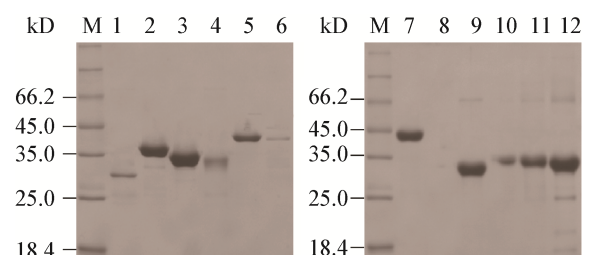


图 1 重组氧化还原酶的 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 1 SDS-PAGE analysis of purified recombinant oxidoreductases

注：M：Marker；1–12：纯化重组氧化还原酶 ADHR、C1、C2、CR2、CR4、KRD、OYE、RCR、S1、SCR、SCR1、SCR3。

Note: M: Marker; 1–12: Purified recombinant oxidoreductases ADHR, C1, C2, CR2, CR4, KRD, OYE, RCR, S1, SCR, SCR1, SCR3.

2.2 重组氧化还原酶催化还原 DKTP 的活性和选择性分析

分别测定 12 种重组氧化还原酶催化还原 DKTP 的活性及其相应产物 DHTP 的立体构型, 结果如表 1 所示。其中, CR2、KRD 催化不对称还原 DKTP 的产物构象为(*S*)-型, CR4、OYE 不对称还原 DKTP 的产物结构为(*R*)-型。在催化(*S*)-专一性不对称还原 DKTP 的氧化还原酶中, CR2 的比活和选择性均明显高于 KRD, 且产物为光学纯的(*S*)-型单一对映体(图 2)。由于度洛西汀的两种对映异构体中只有(*S*)-型具有药理活性, 因此 CR2 在不对称合成

度洛西汀医药中间体的催化转化方面具有较为明显的应用潜力, 并以 CR2 作为目标氧化还原酶进行催化性质的研究。

2.3 重组氧化还原酶 CR2 不对称还原 DKTP 的催化性质

2.3.1 重组氧化还原酶 CR2 的动力学参数分析: 测定并计算不同底物浓度下重组酶 CR2 的酶促反应速率, 并利用 Lineweaver-Burk 作图法获得重组酶的动力学参数, 结果如图 3 所示, 所得 $K_m=0.135$ mmol/L, $k_{cat}=0.498$ s⁻¹, $k_{cat}/K_m=3.689$ 。已有文献报道表明, CR2 对环类羰基化合物的亲和性

表 1 重组氧化还原酶不对称还原 DKTP

Table 1 Asymmetric reduction of DKTP by purified recombinant oxidoreductases

重组氧化还原酶 Recombinant oxidoreductases	基因数据库序列编号 GenBank accession No.	比活 Specific activity (U/mg)	产物构型 Product configuration	光学纯度 Optical purity (% e.e.)
ADHR	AY267012	—	—	—
C1	AB084515	—	—	—
C2	AB084516	—	—	—
CR2	AB183149	1.16	S	99.9
CR4	E59061	0.58	R	99.9
KRD	AF178079	0.39	S	32.7
OYE	AB126227	1.25	R	99.9
RCR	DQ295067	—	—	—
S1	AB036927	—	—	—
SCR	DQ675534	—	—	—
SCR1	FJ939565	—	—	—
SCR3	FJ939564	—	—	—

注: e.e.: 对映体过量。

Note: e.e.: Enantiomeric excess.

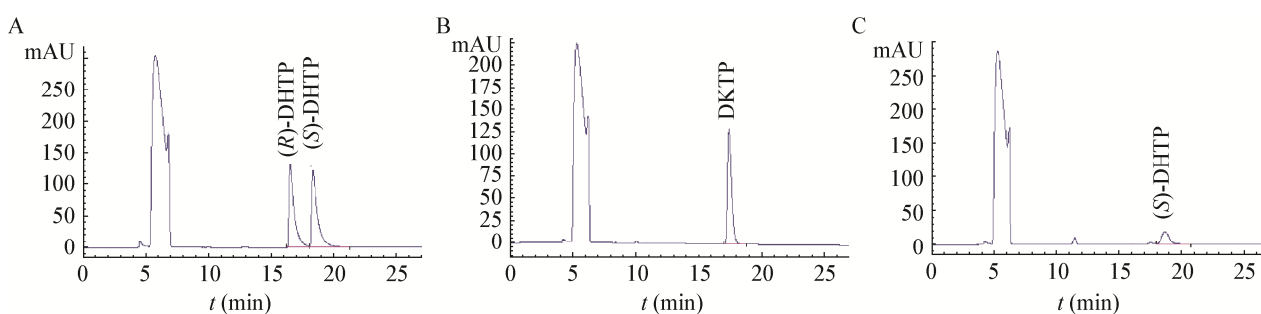


图 2 重组酶 CR2 不对称还原 DKTP 的产物分析

Figure 2 Analysis of chiral products from asymmetric reduction of DKTP by purified recombinant CR2

注: A: (*R*)-DHTP (保留时间, 16.4 min)和(*S*)-DHTP (保留时间, 18.3 min)的标准样; B: 没有酶作用的 DKTP (保留时间, 17.3 min); C: 反应产物。

Note: A: Standard samples (*R*)-DHTP (retention time, 16.4 min) and (*S*)-DHTP (retention time, 18.3 min); B: DKTP without enzyme (retention time, 17.3 min); C: Reaction products.

较高,其 K_m 值约为 0.5 mmol/L,而对脂肪链类羰基化合物的亲和性较低,其 K_m 值约为 6.0 mmol/L^[19]。DKTP 作为酶促还原底物,是一种杂环类羰基化合物,其 K_m 值低于 0.5 mmol/L,表明 CR2 对 DKTP 亲和性较强,有利于其催化 DKTP 的还原反应。

2.3.2 重组氧化还原酶 CR2 的最适 pH 值和最适反应温度: 在不同 pH 梯度(6.0–9.0)下测定重组氧化还原酶 CR2 的相对酶活(图 4),所用缓冲液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) (pH 6.0–8.0)、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–8.5)和 0.1 mol/L 三乙醇胺缓冲液(TEA) (pH 7.5–9.0)。研究表明, pH 值在小于 7.0 的范围内对 CR2 的酶活影响较大;在 pH 7.5–9.0 之间,CR2 的相对酶活在 50%以上;在 pH 8.4 (0.1 mol/L TEA)时,CR2 催化 DKTP 的活性最高。研究结果与已有报道相符,即 CR2 在中性偏碱性条件下,对环类羰基化合物的催化性能较好,而对脂肪链类羰基化合物的催化性能较差^[19-20]。

在不同温度梯度(20–80 °C)下测定重组氧化还原酶 CR2 的相对酶活(图 5)。研究发现,在 25–40 °C 范围内,CR2 的相对活性较高,保持在 80%以上;在 20–35 °C 范围内,随着温度的升高,CR2 的活性不断上升,并在 35 °C 时活性达到最大值;当温度大于 40 °C 时 CR2 的活性开始下降,当温度高于 55 °C 时完全失活。研究结果与 CR2 催化 4-氯乙酰乙酸乙酯的最适温度基本一致^[20]。目前已知可催化合成度洛西汀中间体的氧化还原酶,如来源于 *Exiguobacterium* sp.和 *C. tropicalis* 的氧化还原酶,其最适温度均为 30 °C。与之相比,CR2 具有更高的最适反应温度,更有利于反应的进行^[11-12]。

2.3.3 重组氧化还原酶 CR2 的热稳定性、酸碱耐受性: 将重组氧化还原酶 CR2 的纯酶分别置于不同温度(15–70 °C)处理 12 h,测定其温度稳定性(图 6)。在温度低于 45 °C 时,处理 12 h 的 CR2 还可以保持 80%以上的活性;当温度继续升高时,酶的活性下降,甚至完全失活,这与原始野生菌株 *C. macedoniensis* 来源的 CR2 的热稳定性基本一致^[19],同时与 CR2 催化 4-氯乙酰乙酸乙酯的热稳定性基

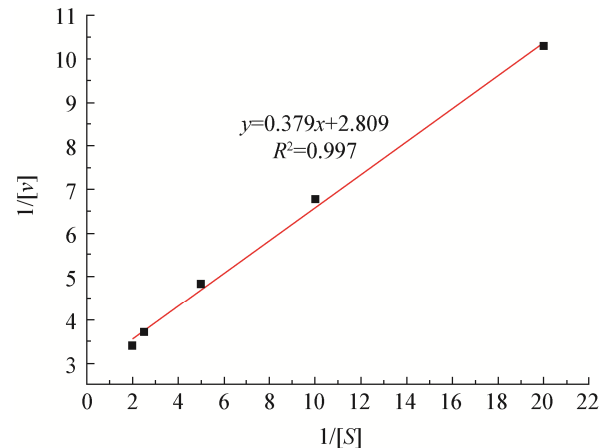


图3 重组酶 CR2 的双倒数曲线

Figure 3 Recombinant CR2 double reciprocal curve

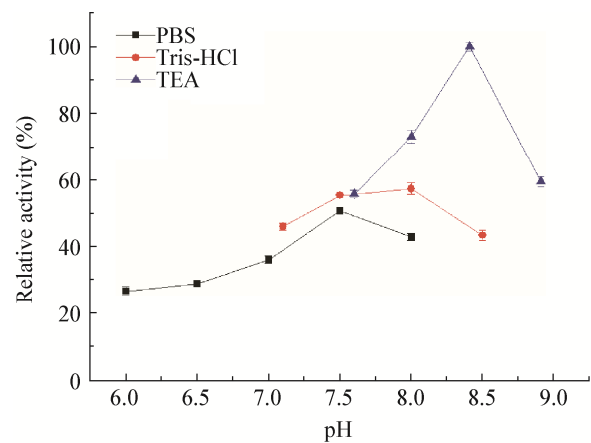


图4 pH 对 CR2 活性的影响

Figure 4 Effect of pH on recombinant CR2 activity

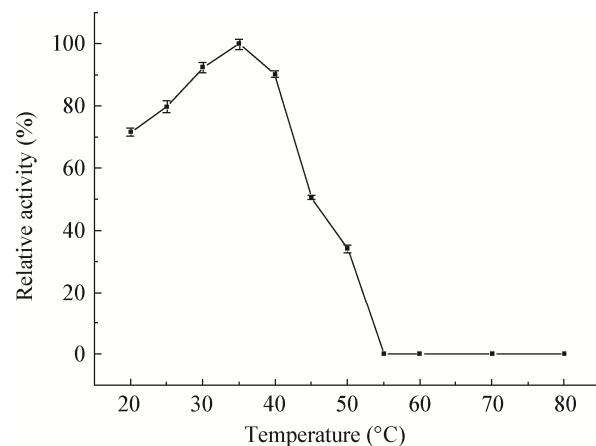


图5 温度对重组酶 CR2 活性的影响

Figure 5 Effect of temperature on recombinant CR2 activity

本一致^[20], 即在 10–45 °C 较为稳定。

将重组氧化还原酶 CR2 于 4 °C 分别置于不同 pH 梯度(6.0–9.0)处理 12 h, 测定其酸碱耐受性(图 7)。在 pH 6.0–9.0 范围内, 处理 12 h 的 CR2 均保持 75% 以上的活性, 并且在 pH 7.5–8.5 范围内, CR2 的活性可以保持在 90% 以上, 这与原始野生菌株 *C. macedoniensis* 来源的 CR2 的酸碱耐受性基本一致^[19], 即在中性偏碱性条件下较为稳定。

2.3.4 金属离子对重组氧化还原酶 CR2 活性的影响: 已有报道某些分类的氧化还原酶需要金属离子激活, 因此考察了金属离子对 CR2 活性的影响。如表 2 所示, 首先考察金属离子螯合剂 EDTA(Na)₂ 对重组 CR2 活性的影响, 在反应体系中添加终浓度为 1 mmol/L 的金属离子螯合剂 EDTA(Na)₂, 其对 CR2 的活性有抑制作用, 即 CR2 需要某种金属离子激活; 进一步在反应体系中分别添加终浓度为

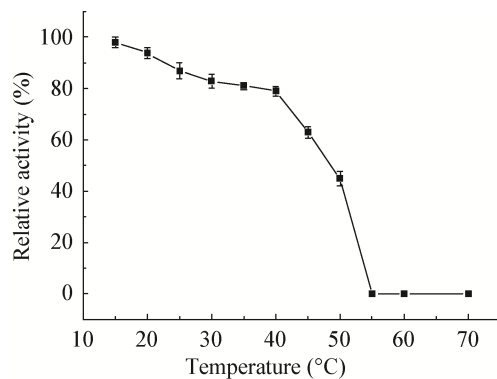


图 6 重组酶 CR2 的热稳定性

Figure 6 Thermal stability of recombinant CR2

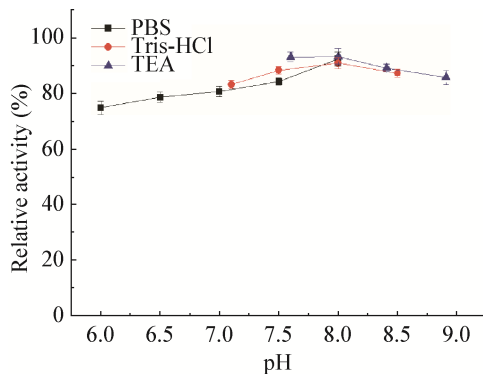


图 7 pH 对 CR2 稳定性的影响

Figure 7 Effects of pH on recombinant CR2 stability

1 mmol/L 的不同金属离子(CaCl₂、CuSO₄、FeSO₄、FeCl₃、MgSO₄、MnCl₂、NiSO₄和 ZnSO₄), 考察了其对于重组 CR2 活性的影响。其中, Zn²⁺对 CR2 酶活具有激活作用, 可使 CR2 活性得到恢复, 而其他金属离子对 CR2 的活性具有一定影响。研究结果说明, CR2 是金属离子依赖型的立体选择性氧化还原酶, Zn²⁺对 CR2 活性具有促进作用。

2.4 重组氧化还原酶 CR2 催化 DKTP 的不对称还原

在 0.1 mol/L TEA 缓冲液(pH 8.4)和 35 °C 条件下, 将纯化所得 CR2 催化 1 g/L DKTP 反应不同时间, HPLC 检测反应产物(*S*)-DHTP 的产率和光学纯度, 结果如图 8 所示。在 CR2 催化 DKTP 不对称还原的反应过程中, 仅能检测到(*S*)-DHTP 单一映体产物, 产物在反应 0–4 h 内快速生成和积累, 反应

表 2 金属离子对重组 CR2 活性的影响
Table 2 Effect of metal ions on recombinant CR2 activity

化合物 Compound	CR2 相对酶活 Relative activity of CR2 (%)
No addition	100
EDTA(Na) ₂	80
CaCl ₂	23
CuSO ₄	65
FeSO ₄	84
FeCl ₃	35
MgSO ₄	36
MnCl ₂	70
NiSO ₄	63
ZnSO ₄	108

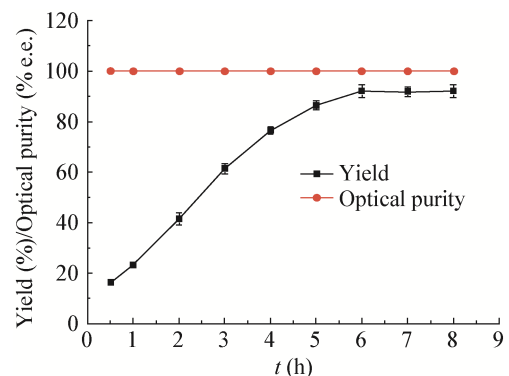


图 8 CR2 最佳反应时间的测定

Figure 8 The determination of optimum reaction time of CR2

4 h 产物产率即可达到 80%，在反应 4–6 h 内产率增长速率逐渐减缓，并于反应 6 h 时产率达到最大值 92.1%，后续时间内产率保持稳定。已有文献[12-13,16]报道，来源于 *C. viswanathii*、*C. tropicalis* 的氧化还原酶催化不对称还原 1 g/L DKTP 所需的反应时间长达 60 h，并且产率只有 80% 左右。因此，重组氧化还原酶 CR2 具有进一步高效催化不对称还原 DKTP 生成度洛西汀中间体(S)-DHTP 的应用潜力。

3 结论

(S)-DHTP 是生产度洛西汀的重要中间体，可由 DKTP 不对称还原获得。本研究从具有不同催化特性的多种立体选择性氧化还原酶出发，以 DKTP 为底物，获得高立体选择性不对称还原 DKTP 生成度洛西汀中间体(S)-DHTP 的立体选择性氧化还原酶 CR2。该酶对于 DKTP 底物具有较强的亲和性，最适 pH 为 pH 8.4 (0.1 mol/L TEA)，最适反应温度为 35 °C，在 10–45 °C 和 pH 7.5–8.5 条件下较为稳定，Zn²⁺对该酶的催化活性具有促进作用。在最适条件下，重组氧化还原酶 CR2 催化不对称还原 DKTP 获得产物(S)-DHTP 的产率达 92.1%，光学纯度达 99.9%。相比于其他已报道的可作用于 DKTP 生物合成(S)-DHTP 的菌种和氧化还原酶，如 *Exiguobacterium* sp.、*Thermoanaerobacter* sp.、*C. tropicalis*、*C. viswanathii* 等菌株及其功能酶^[10-13,16]，CR2 具有适于转化反应的酶学性质，并能够高立体选择性催化不对称还原 DKTP 生成度洛西汀中间体(S)-DHTP，具有一定的应用潜力。

参考文献

- [1] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis[J]. *Science*, 2003, 299(5613): 1694-1697
- [2] Liu HL, Hoff BH, Anthonsen T. Chemo-enzymatic synthesis of the antidepressant duloxetine and its enantiomer[J]. *Chirality*, 2000, 12(1): 26-29
- [3] Vey EL, Kovelman I. Adverse events, toxicity and post-mortem data on duloxetine: case reports and literature survey[J]. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2010, 17(4): 175-185
- [4] Reddy PRM, Sreeramulu J, Naidu PY, et al. Stability indicating fast LC for the simultaneous estimation of intermediates and degradants of duloxetine hydrochloride[J]. *Chromatographia*, 2010, 71(1/2): 95-100
- [5] Tang CG, Lin H, Zhang C, et al. Highly enantioselective bioreduction of *N*-methyl-3-oxo-3-(thiophen-2-yl) propanamide for the production of (S)-duloxetine[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(7): 1435-1440
- [6] Xiao ZJ, Du PX, Lou WY, et al. Using water-miscible ionic liquids to improve the biocatalytic anti-Prelog asymmetric reduction of prochiral ketones with whole cells of *Acetobacter* sp CCTCC M209061[J]. *Chemical Engineering Science*, 2012, 84: 695-705
- [7] Yamamoto H, Kudoh M. Novel chiral tool, (R)-2-octanol dehydrogenase, from *Pichia finlandica*: purification, gene cloning, and application for optically active alpha-haloalcohols[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8087-8096
- [8] Hollmann F, Arends IWCE, Holtmann D. Enzymatic reductions for the chemist[J]. *Green Chemistry*, 2011, 13(9): 2285-2314
- [9] Wohlgenuth R. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(3): 283-292
- [10] Breuer M. Method for production of (1S)-3-chloro-1-(2-thienyl)propan-1-ol using alcohol dehydrogenase from thermoanaerobacter: US, US7790436[P]. 2010-09-07
- [11] Wada M, Yoshizumi A, Furukawa Y, et al. Cloning and overexpression of the *Exiguobacterium* sp. F42 gene encoding a new short chain dehydrogenase, which catalyzes the stereoselective reduction of ethyl 3-oxo-3-(2-thienyl) propanoate to ethyl (S)-3-hydroxy-3-(2-thienyl) propanoate[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(7): 1481-1488
- [12] Soni P, Banerjee UC. Biotransformations for the production of the chiral drug (S)-Duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(6): 771-777
- [13] Soni P, Kansal H, Banerjee UC. Optimization of process parameters for the production of carbonyl reductase by *Candida viswanathii* in a laboratory-scale fermentor[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(3): 167-173
- [14] Guo RY, Nie Y, Mu XQ, et al. A novel aldo-keto reductase for the biocatalytic synthesis of (S)-N, N-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014, 33(9): 2344-2349 (in Chinese)
郭荣云, 聂尧, 穆晓清, 等. 新型醛酮还原酶不对称转化制备(S)-N, N-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺[J]. *化工进展*, 2014, 33(9): 2344-2349
- [15] Zhang DL, Chen X, Chi J, et al. Semi-rational engineering a carbonyl reductase for the enantioselective reduction of β -amino ketones[J]. *ACS Catalysis*, 2015, 5(4): 2452-2457
- [16] Kansal H, Banerjee UC. Enhancing the biocatalytic potential of carbonyl reductase of *Candida viswanathii* using aqueous-organic solvent system[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1041-1047
- [17] Shen YX. Biotransformations of (S)-N,N-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2009 (in Chinese)
沈云霞. 度洛西汀中间体手性醇的生物转化[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2009
- [18] Qiao YY, Fan DD, Deng JJ, et al. The purification of recombinant human-like collagen by Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography[J]. *Highlights of Sciencepaper Online*, 2013, 6(5): 402-406 (in Chinese)
乔媛媛, 范代娣, 邓建军, 等. 镍离子亲和层析纯化重组类人胶原蛋白[J]. *中国科技论文在线精品论文*, 2013, 6(5): 402-406
- [19] Kataoka M, Doi K, Sim T, et al. A novel NADPH-dependent carbonyl reductase of *Candida macedoniensis*: purification and characterization[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 294(2): 469-474
- [20] Chen XX. Asymmetric enzymatic reduction of prochiral β -ketoesters by enzyme-coupled system[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
陈星星. 酶偶联法不对称还原原手性 β -酮酯类化合物的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014