

双酶体系高效制备(*R*)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙醇

朱利娟¹, 余涛¹, 顾颖², 杨标², 邬敏辰^{*2}

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 人工合成经密码子优化的羧基还原酶基因 *SysI*, 并与葡萄糖脱氢酶基因 *Sygdh* 共克隆至双启动子表达质粒 pETDuet-1 中, 获重组质粒 pETDuet-*Sygdh-SysI*。将其转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3), 构建了共表达羧基还原酶和葡萄糖脱氢酶的重组工程菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-SysI*。以经 IPTG 诱导的重组菌为生物催化剂, 不对称还原间-氯苯甲酰甲基氯 (*m*-CPC), 制备手性药物中间体 (*R*)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙醇 ((*R*)-CCE)。在 *m*-CPC 30 mmol/L、重组湿菌体 70 mg/mL、葡萄糖 40 mmol/L、辅酶 NADP⁺ 0.2 mmol/L, 以及 pH 7.0、反应温度 40 °C 和反应时间 3 h 等条件下, 所获手性化合物 (*R*)-CCE 的摩尔产率高达 99.0%, 对映体过量值 (e.e. 值) 为 100%。

关键词: 双酶体系; 羧基还原酶; 葡萄糖脱氢酶; 共表达; (*R*)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙醇

中图分类号: Q 814.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)03—0278—06

Efficient Preparation of (*R*)-2-Chloro-1-(3-Chlorophenyl) Ethanol by a Double Enzyme System

ZHU Lijuan¹, YU Tao¹, GU Ying², YANG Biao², WU Minchen^{*2}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A codon-optimized gene *SysI*, which encodes a carbonyl reductase, was synthesized, and cloned into an expression plasmid pETDuet-1 with double promoters together with a glucose dehydrogenase-encoding gene *Sygdh*. The recombinant *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-SysI*, expressing the carbonyl reductase and the glucose dehydrogenase together, was constructed by transforming the recombinant plasmid, pETDuet-*Sygdh-SysI*, into *E. coli* BL21 (DE3). Using recombinant *E. coli* cells induced by IPTG as biocatalysts, (*R*)-2-chloro-1-(3-chlorophenyl) ethanol ((*R*)-CCE), a chiral drug intermediate, was synthesized by asymmetrically reducing *m*-chlorophenacyl chloride (*m*-CPC). Under the reaction conditions of 30 mmol/L of *m*-CPC, 70 mg/mL of wet recombinant *E. coli* cells, 40 mmol/L of glucose, 0.2 mmol/L of NADP⁺ at pH 7.0 and 40 °C for 3 h, the molar yield of (*R*)-CCE reached 99.0% with an enantiomeric excess (e.e.) value of 100%.

Keywords: double enzyme system, carbonyl reductase, glucose dehydrogenase, coexpression, (*R*)-2-chloro-1-(3-chlorophenyl) ethanol

收稿日期: 2014-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811)。

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: bioch@163.com

手性醇是合成药物、香料、农药和功能性材料等的重要中间体^[1]。例如, (*R*)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙醇 (2-chloro-1-(3-chlorophenyl)ethanol, (*R*)-CCE) 用于合成多种 β 3-肾上腺素能受体 (adrenergic receptor, AR) 激动剂, 如抗抑郁药 SR 58611A, 减肥药 BRL 37344 等^[2-3]。手性醇的制备可采用化学法和生物法, 而每种方法又可分为拆分法和合成法。化学拆分法或合成法需要昂贵的金属催化剂, 以及对药物中金属离子的含量有严格标准, 从而限制了其广泛的应用^[4-6]。迄今为止, 采用生物拆分法制备手性醇的报道较多, 然而外消旋体拆分所获某种对映异构体的理论产率仅为 50%^[7]。

近年来采用生物合成法不对称还原羰基化合物制备手性醇已成为热点:

如 Lin 等^[8] 利用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 不对称还原间-氯苯甲酰甲基氯 (*m*-chlorophenacyl chloride, *m*-CPC) 合成 (*R*)-CCE, 其产率达到 97%, 对映体过量 (enantiomeric excess, e.e.) 值为 99%。

倪晔等^[9] 利用安大略假丝酵母 (*Candida ontarioensis*) 还原 *m*-CPC 所获 (*R*)-CCE 的产率和 e.e. 值分别为 97.5% 和 99.5%。

朱敦明等^[10] 研究发现, 来源于木兰假丝酵母 (*C. magnoliae*) 的羰基还原酶 (EC 1.1.1.184) S1 可以催化苯乙酮及其衍生物生成相应的手性醇, 但未对 *m*-CPC 进行研究。

本研究基于羰基还原酶 S1 编码基因 *s1* 的核苷酸序列 (GenBank 登录号: AB036927), 针对 *E. coli* 密码子偏爱性对编码基因 *s1* 进行密码子优化及人工合成, 命名为 *Sys1*。由于羰基还原酶催化的还原反应需要辅酶 NADPH 的参与, 昂贵的辅酶限制了其应用, 而葡萄糖脱氢酶^[11] 能够特异性地催化 D-葡萄糖生成葡萄糖酸, 并伴随 NADP⁺ 向辅酶 NADPH 的转化。本研究中将 *Sys1* 与葡萄糖脱氢酶基因 *Sygdh*^[11] 分别克隆至 pETDuet-1 双启动子的下游, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 构建共表达两种酶的重组工程菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-Sys1*, 从而实现底物 *m*-CPC 的还原和辅酶 NADPH 的再生循环, 如图 1 所示。为制备高摩尔产率和高 e.e. 值的 (*R*)-CCE, 研究中还对比了重组菌催化 *m*-CPC 不对称还原反应的条件 (如底物、菌体、葡萄糖和辅酶浓度等) 进行了优化。

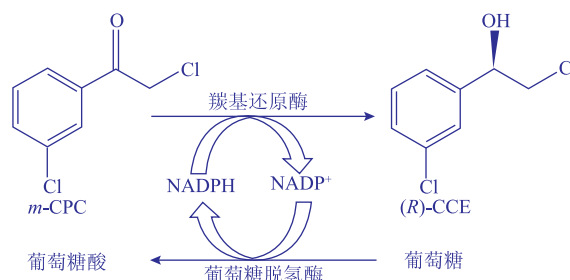


图 1 重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-Sys1* 不对称还原 *m*-CPC 制备 (*R*)-CCE

Fig. 1 Synthesis of (*R*)-CCE by asymmetrically reducing *m*-CPC using the recombinant *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-Sys1*

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

重组质粒 pET28a-*Sygdh*, 由作者所在实验室构建和保藏; 大肠杆菌 *E. coli* JM109, BL21(DE3) 和表达质粒 pETDuet-1, 购自 Novagen 公司; 克隆质粒 pUCm-T, 购自上海 Sangon 公司。

LB 培养基 (g/dL): 蛋白胨 1, 酵母提取物 0.5, NaCl 1 (固体培养基添加 1.5 g/dL 琼脂粉); pH 7.2。

1.2 主要试剂和仪器

各种限制性内切酶, *rTaq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, DNA Markers 和蛋白质 Marker, 购自大连 TaKaRa 公司; IPTG 和 EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 购自上海 Sangon 公司; NADPH 和 NADP⁺, 购自上海源叶生物科技有限公司; *m*-CPC, (*R*)-CCE 和 (*S*)-CCE, Sumitomo 公司产品; 外消旋体 (*R,S*)-CCE, 由作者所在实验室合成; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

GC-2014 型气相色谱仪, 购于日本 Shimadzu 公司; CP-Chirasil-DEX CB 手性气相色谱柱 (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 购于美国 Agilent 科技公司。

1.3 密码子优化及基因 *Sys1* 合成

不同的宿主细胞对密码子有不同的偏爱性^[12]。为高效表达羰基还原酶, 参照宿主细胞 *E. coli* 的密码子偏爱性表, 对源自木兰假丝酵母的羰基还原酶基因 *s1* 中的稀有密码子进行替换, 并在基因 5' 和 3' 端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。将密码子优化后的基因命名为 *Sys1* (GenBank 登录号: KJ522844), 由上海 Sangon 公司合成并与 pUCm-T 连接, 获重组质粒 pUCm-T-*Sys1*。

1.4 重组菌的构建及诱导表达

用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切 pUCm-T-*Sys* I, 割胶回收目的基因 *Sys* I, 与经同样双酶切的质粒 pETDuet-1 连接, 获重组质粒 pETDuet-*Sys* I; 再用 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切 pET28a-*Sygdh*, 割胶回收 *Sygdh*, 与经同样双酶切的 pETDuet-*Sys* I 连接, 获含有双基因的重组质粒 pETDuet-*Sygdh-Sys* I。该重组质粒经测序验证正确后转化 *E. coli* BL21(DE3), 获重组工程菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-Sys* I。该重组菌的诱导表达参见文献[11]。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用磷酸钾缓冲液 (100 mmol/L、pH 7.0) 洗涤菌体两次, 用于 SDS-PAGE 分析和催化底物 *m*-CPC 还原反应, 未经 IPTG 诱导的重组菌用作阴性对照。

1.5 辅酶 NADPH 的再生循环

在磷酸钾缓冲液 (100 mmol/L、pH 7.0) 中加入

10 mg 经 IPTG 诱导的湿菌体、终浓度 50 mmol/L 葡萄糖、1 mmol/L NADPH 或 NADP⁺ 和 2 mmol/L *m*-CPC, 用缓冲液定容至 1 mL, 置于 40 °C、220 r/min 摇床上反应 12 h。8 000 r/min 离心 10 min, 取 0.6 mL 上清液加入 1 mL 乙酸乙酯, 激烈震荡后吸取上层有机相, 无水硫酸镁干燥, 过 0.22 μm 有机膜, 用于气相色谱分析。

1.6 (R)-2-氯-1-(3-氯苯基)乙醇的分析

样品分析采用 GC-2014 气相色谱仪、CP-Chirasil-DEX CB 手性气相色谱柱和氢火焰离子检测器。参数设置: 进样口和检测器温度均为 250 °C; 初始柱温 145 °C 维持 2 min, 再以 5 °C/min 升温至 200 °C; 载气氮气, 体积流量 2.0 mL/min, 分流比 1:50。在此检测条件下, *m*-CPC、(R)-CCE 和 (S)-CCE 的出峰时间分别为 8.172、10.975 和 11.184 min, 如图 2 所示。

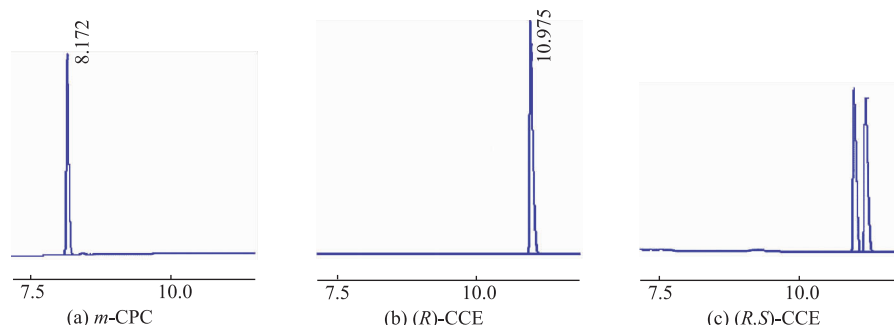


图 2 *m*-CPC 和 CCE 的气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatograms of *m*-CPC and CCE

$$r = (n_1/n_2) \times 100\% \quad (1)$$

$$e = (n_3/n_4) \times 100\% \quad (2)$$

式(1)(2)中, r 为摩尔产率; n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 分别为 (R)-CCE、*m*-CPC、(R)-CCE-(S)-CCE、(R)-CCE+(S)-CCE 物质的量 (mol); e 为对映体过量值 (e.e. 值)。

1.7 重组菌催化条件的优化

在磷酸钾缓冲液 (100 mmol/L、pH 7.0) 中加入不同终浓度的 *m*-CPC、湿菌体、葡萄糖和 NADP⁺, 用缓冲液定容至 1 mL, 在 40 °C、220 r/min 催化反应 6 h。反应样品参照 1.5 和 1.6 进行处理和分析, 以 (R)-CCE 的产率为指标, 优化重组菌的催化条件。

2 结果与讨论

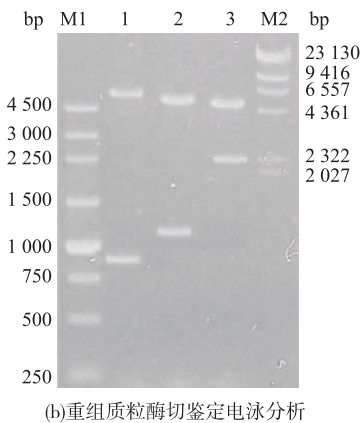
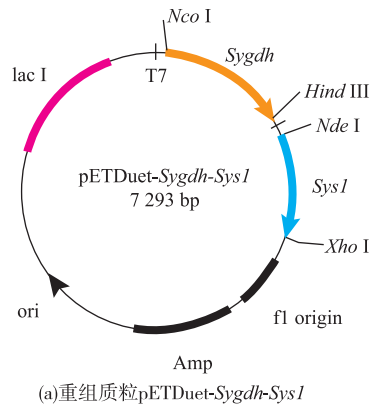
2.1 含双基因重组表达质粒的构建

用 *Nde* I 和 *Xho* I 分别双酶切 pUCm-T-*Sys* I 和 pETDuet-1, 将目的基因 *Sys* I 与 pETDuet-1 进行连

接、转化 JM109, 筛选得到重组菌 JM109/pETDuet-*Sys* I。再对 pETDuet-*Sys* I 和 pET28a-*Sygdh* 分别进行 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 将基因 *Sygdh* 连接到 pETDuet-*Sys* I 中, 转化 *E. coli* BL21, 筛选得到重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-Sys* I。分别用 *Nde* I 和 *Xho* I、*Nco* I 和 *Hind* III、*Nco* I 和 *Xho* I 双酶切含有双基因的重组质粒 pETDuet-*Sygdh-Sys* I, 见图 3(a), 琼脂糖凝胶电泳分析如图 3(b) 所示, 各基因长度与理论值相符。

2.2 羧基还原酶与葡萄糖脱氢酶的表达与鉴定

重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Sygdh-Sys* I 经 1.0 mmol/L 的 IPTG 于 25 °C 诱导 12 h 后。利用 Quantity One 软件分析 SDS-PAGE 电泳图, 结果显示, 与未诱导的对照组相比 (图 4, 泳道 1), 重组菌 *E. coli* BL21 /pETDuet-*Sygdh-Sys* I 的表达产物在表观相对分子质量 30.0 kDa (羧基还原酶) 和 41.0 kDa

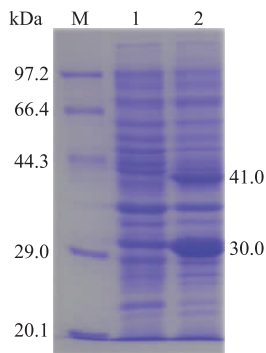


M1:250 bp DNA Marker;1:pETDuet-Sygdh-SysI *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切产物;2:*Nco* I 和 *Hind* III 双酶切产物;3:*Nco* I 和 *Xho* I 双酶切产物;M2: λ -*Hind* III digest DNA Ladder Marker

图3 pETDuet-Sygdh-SysI 及其酶切产物电泳图

Fig. 3 pETDuet-Sygdh-SysI and its digestion by *Nde* I / *Xho* I , *Nco* I/*Hind* III and *Nco* I/*Xho* I , respectively

(葡萄糖脱氢酶)处有明显的蛋白质条带(图4,泳道2)。结果表明 *Sygdh* 和 *SysI* 基因在大肠杆菌中实现了高效表达。



M:蛋白质 Marker;1:未诱导的重组菌;2:诱导后重组菌

图4 重组蛋白质的 SDS-PAGE 分析图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins

2.3 NADPH 再生循环的验证

利用重组菌做反应前,需要验证辅酶再生的可能性。由表1反应体系1、2、3可知,葡萄糖脱氢酶成功完成辅酶的再生循环,且葡萄糖参与的体系3的产率是体系2的2.2倍。比较体系3、4、5的产率可知,NADP⁺和NADPH作用相当,由于NADPH的价格比较昂贵,用NADP⁺替代NADPH参与生物催化反应。

表1 不同反应体系分析辅酶再生

Table 1 Analysis of cofactor regeneration with difference reaction systems

反应体系	产率/%	e.e.值/%
1: <i>E. coli</i> BL21/pETDuet-Sygdh-SysI + 底物	未检出	未检出
2: <i>E. coli</i> BL21/pETDuet-Sygdh-SysI + 底物 + NADPH	43.2%	100
3: <i>E. coli</i> BL21/pETDuet-Sygdh-SysI + 底物 + NADPH + 葡萄糖	98.7%	100
4: <i>E. coli</i> BL21/pETDuet-Sygdh-SysI + 底物 + NADP ⁺	未检出	未检出
5: <i>E. coli</i> BL21/pETDuet-Sygdh-SysI + 底物 + NADP ⁺ + 葡萄糖	98.0%	100

2.4 重组菌催化条件的优化

2.4.1 底物浓度对转化反应的影响 重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-Sygdh-SysI 转化体系中,底物 *m*-CPC 初始浓度为10~30 mmol/L时,产物(R)-CCE的产率变化不大,如图5所示。当底物浓度高于30 mmol/L时,产物的产率开始降低,这可能是由于过高的底物浓度使酶的活性中心饱和,从而造成酶的催化效率下降,但这个反应过程中 e.e.值并不因受底物浓度的改变而改变。

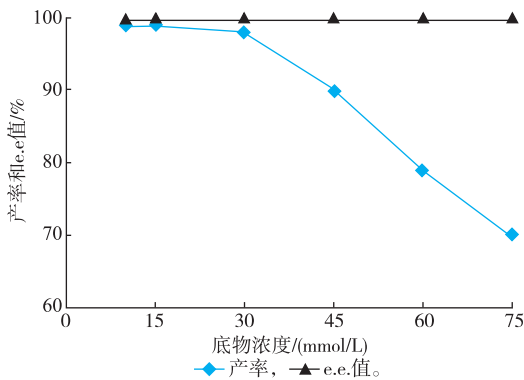


图5 底物 *m*-CPC 初始浓度对转化反应的影响

Fig. 5 Effect of initial substrate concentration on biotransformation reaction

2.4.2 菌体浓度对转化反应的影响 由图 6 可知,当底物初始浓度为 30 mmol/L、菌体湿质量浓度为 50~70 mg/mL 时,摩尔产率随细胞质量浓度的增加而增大;当细胞质量浓度为 70、80、90、100 mg/mL 时,得率分别为 99.2%、99.6%、99.6%、99.8%,基本不变。可能是在一定范围内,菌体质量浓度增加导致参加催化反应的细胞内酶分子数增加,可提供给底物分子的活性结合位点增加,因而反应体系的催化效率明显提高。

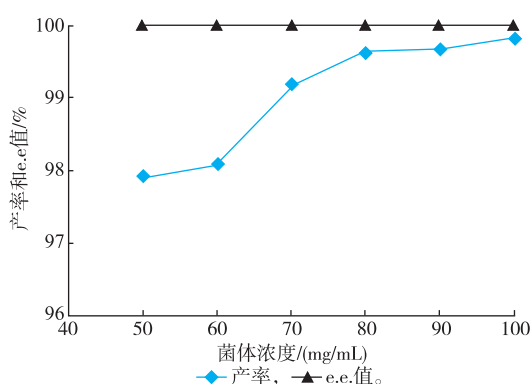
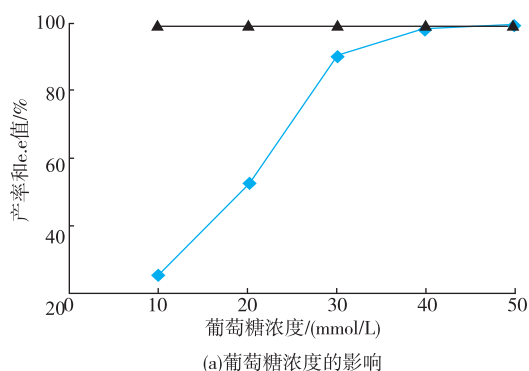


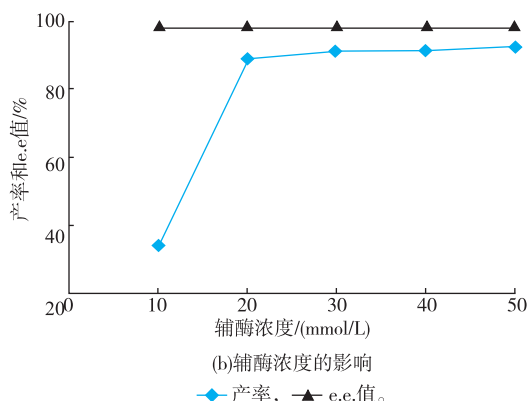
图 6 菌体质量浓度对转化反应的影响

Fig. 6 Effect of cell concentration on biotransformation reaction

2.4.3 葡萄糖和辅酶浓度对反应的影响 葡萄糖作为辅助底物参与辅酶的循环,在底物浓度 30 mmol/L、菌体湿质量浓度 70 mg/mL、葡萄糖浓度 10~40 mmol/L 时,产率随着葡萄糖浓度的增加而增加。当葡萄糖浓度超过 40 mmol/L 后产率基本不变,见图 7(a)。辅酶(NADP⁺)理论上只需一点启动反应后,在葡萄糖脱氢酶的作用下就可以驱动辅酶作循环,完成生物催化反应,图 7(b)表明 0.2 mmol/L 辅酶(NADP⁺)就能够完成底物 99.0%的转化率。



(a)葡萄糖浓度的影响



(b)辅酶浓度的影响

—◆— 产率, —▲— e.e.值。

图 7 葡萄糖和辅酶浓度对转化反应的影响

Fig. 7 Effect of glucose and NADP⁺ concentrations on biotransformation reaction

2.4.4 反应时间对反应的影响 由图 8 可知,在底物浓度、湿菌体质量浓度、葡萄糖浓度、辅酶浓度、pH 值和反应温度分别为 30 mmol/L、70 mg/mL、40 mmol/L、0.2 mmol/L、7.0、40 °C 时,双酶体系中的摩尔产率在 30~90 min 内增加较快,90~180 min 内产率增加较慢,而 180 min 后基本不变,摩尔产率可达到 99%,此时反应时间由之前的 6 h 缩短到 3 h,整个过程中 e.e.值一直保持 100%不变。

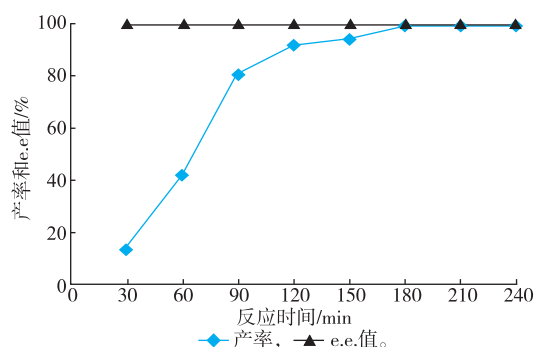


图 8 反应时间对转化反应的影响

Fig. 8 Effect of reaction time on biotransformation reaction

3 结语

由于(R)-CCE 是重要的药物中间体,将密码子优化后的羧基还原酶基因 *SysI* 和葡萄糖脱氢酶基因 *Sygdh* 构建双酶共表达重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-Sygdh-SysI,并作为生物催化剂。研究了反应条件对合成 (R)-CCE 效率的影响。研究结果表明,在底物 30 mmol/L、菌体 70 mg/mL、葡萄糖 40 mmol/L、辅酶 0.2 mmol/L、pH 7.0、反应温度

40 ℃、反应时间 3 h 条件下,合成产物(*R*)-CCE 的摩尔产率达 99.0%,e.e.值可达 100%。同时本研究工

作也为生物催化解决辅酶再生问题奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 郁惠蕾,黄磊,倪燕,等. 羰基生物还原法合成手性醇的研究进展[J]. 生物加工过程,2013,11(3):71-82.
YU Huilei, HUANG Lei, NI Yan, et al. Advances in synthesis of chiral alcohols by carbonyl bioreduction[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2013, 11(3): 71-82. (in Chinese)
- [2] Harada H, Hirokawa Y, Suzuki K, et al. Novel and potent human and rat β 3-adrenergic receptor agonists containing substituted 3-indolylalkylamines[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2003, 13(7): 1301-1305.
- [3] Devocelle M, Mortreux A, Agbossou F, et al. Alternative synthesis of the chiral atypical β -adrenergic phenylethanolamino-tetraline agonist SR58611A using enantioselective hydrogenation[J]. **Tetrahedron Letters**, 1999, 40(24): 4551-4554.
- [4] 儿玉浩宣, 本河卓也, 山口博志, 等. 2- 卤代 -1-(取代苯基)乙醇的生产: 中国, CN1063422C[P]. 2001-03-21.
- [5] Ohkuma T, Tsutsumi K, Utsumi N, et al. Asymmetric hydrogenation of α -chloroaromatic ketones catalyzed by η 6-arene/TsDPEN- ruthenium(II) complexes[J]. **Organic Letters**, 2007, 9(2): 255-257.
- [6] Thayer A. Removing impurities: Metal scavengers and immobilized catalysts may make for cleaner pharmaceutical products[J]. **Chemical & Engineering News**, 2005, 83(36): 55-58.
- [7] Xia S W, Lin H, Chen Y Z. Preparation of (*R*)-2-chloro-1- (m-chlorophenyl)ethanol by Lipozyme TL IM-catalyzed second resolution[J]. **Chinese Chemical Letters**, 2012, 23(3): 289-292.
- [8] Lin H, Chen Y Z, Xu X Y, et al. Preparation of key intermediates of adrenergic receptor agonists: Highly enantioselective production of (*R*)- α -halohydrins with *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC 2.396 [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2009, 57: 1-5.
- [9] Ni Y, Zhang B H, Sun Z H. Efficient synthesis of (*R*)-2-chloro-1- (3-chlorophenyl)ethanol by permeabilized whole cells of *Candida ontarioensis*[J]. **Chinese Journal of Catalysis**, 2012, 33(4): 681-687.
- [10] Zhu D M, Yang Y, Hua L. Stereoselective enzymatic synthesis of chiral alcohols with the use of a carbonyl reductase from *Candida magnoliae* with anti-Prelog enantioselectivity[J]. **Journal of Organic Chemistry**, 2006, 71(11): 4202-4205.
- [11] 余涛, 胡蝶, 邬敏辰, 等. 重组葡萄糖脱氢酶的酶学性质及其偶联辅酶再生[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(9): 910-916.
YU Tao, HU Die, WU Minchen, et al. Enzymatic characterization and coenzyme regeneration of a recombinant glucose 1-dehydrogenase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(9): 910-916. (in Chinese)
- [12] 金光泽, 段作营, 张莲芬, 等. 重组融合人血清白蛋白 - 人白介素 -2C125A 突变体在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(4): 595-601.
JIN Guangze, DUAN Zuoying, ZHANG Lianfen, et al. Expression of the fusion protein human serum albu/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(4): 595-601. (in Chinese)