

醇脱氢酶催化合成(S)-哌啶醇及产物抑制机制

吴彦霏^{1,2}, 许国超^{1,2}, 周婕妤^{1,2}, 倪晔^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: (S)-N-Boc-3-羟基哌啶((S)-NBHP)是治疗套细胞淋巴瘤药物——依鲁替尼的关键手性中间体。利用醇脱氢酶催化 N-Boc-3-哌啶酮(NBPO)的不对称还原是最具开发潜力的(S)-NBHP 合成方法。对醇脱氢酶库进行筛选发现,来源于多孢克鲁维酵母的 *KpADH* 对 NBPO 具有最佳的催化效果,纯酶活力高达 83.9 U/mg,产物对映体过量值为 97.0%(S)。将其与葡萄糖脱氢酶偶联,并考察了单水相、两相、离子液体和不同底物浓度对转化反应的影响。结果表明:高浓度产物(S)-NBHP 对 *KpADH* 存在抑制作用,抑制动力学分析表明属于非竞争性抑制。采用单水相体系可降低(S)-NBHP 对 *KpADH* 催化反应的抑制,有利于转化效率的提高。初步探究了醇脱氢酶催化 NBPO 不对称还原反应的抑制现象,对酶法合成(S)-NBHP 具有指导意义。

关键词: (S)-N-Boc-3-羟基哌啶;醇脱氢酶;单水相催化;产物抑制;非竞争性抑制

中图分类号:Q 814 文章编号:1673-1689(2021)07-0073-08 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2021.07.009

Biocatalytic Preparation of a (S)-piperidinol by Alcohol Dehydrogenase and Its Product Inhibitory Mechanism

WU Yanfei^{1,2}, XU Guochao^{1,2}, ZHOU Jieyu^{1,2}, NI Ye^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: (S)-N-Boc-3-hydroxypiperidine ((S)-NBHP) is a key chiral intermediate for the synthesis of ibrutinib treating mantle cell lymphoma. Asymmetric reduction of N-Boc-3-piperidone (NBPO) catalyzed by alcohol dehydrogenase is the most promising method for (S)-NBHP synthesis. After screening of the alcohol dehydrogenase library, *KpADH* from *Kluyveromyces polyspora* showed excellent catalytic efficiency on NBPO, with specific activity of pure enzyme as high as 83.9 U/mg and the product enantiomeric excess value of 97.0% (S). Coupled cofactor regeneration reaction was established by introducing glucose dehydrogenase, and the effects of monoaqueous phase, biphasic phase, ionic liquids and different substrate concentrations on the conversion were explored. The results indicated that high concentration product (S)-NBHP had inhibitory effect on *KpADH*, and the inhibitory kinetic analysis showed that it belonged to non-competitive inhibition. The inhibition of (S)-NBHP on *KpADH* catalytic reaction could be reduced and the conversion efficiency could be

收稿日期: 2019-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(21776112);国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFA0901700)。

* 通信作者: 倪晔(1975—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事生物催化和酶工程方面的研究。E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

improved by using single monoaqueous phase catalysis. The inhibition of asymmetric reduction of NBPO catalyzed by alcohol dehydrogenase was studied, which could provide guidance for the enzymatic preparation of (S)-NBHP.

Keywords: (S)-N-Boc-3-hydroxypiperidine, alcohol dehydrogenase, monoaqueous phase catalysis, product inhibition, non-competitive inhibition

大量的天然和非天然生物活性物质分子中有一个或多个哌啶环,包括许多市售的活性药物成分^[1-2]。手性哌啶醇及其衍生物是制药工业中重要的中间体,比如(S)-N-Boc-3-羟基哌啶((S)-NBHP)是合成依鲁替尼药物的关键手性中间体,其市售品名为 Imbruvica,是一种靶向 B 细胞的抗癌药物^[3-5]。依鲁替尼已于 2013 年获得美国食品和药物管理局的批准用于治疗套细胞淋巴瘤,分别于 2014 年和 2015 年获得批准用于治疗慢性淋巴细胞性白血病和淋巴浆细胞性淋巴瘤^[6]。目前手性哌啶醇主要是通过化学方法将原料通过多步转化制备而得,产率和产品纯度不理想^[7]。最近,酮还原酶(KRED)催化 N-Boc-3-哌啶酮(NBPO)的不对称还原反应在手性哌啶醇的合成中显示出良好的性能。2014 年通过商业 KRED 实现 100 g/L NBPO 的生物转化,首开醇脱氢酶合成(S)-NBHP 的先河^[8]。然而,本篇研究中所采用的 KRED 及其后报道的醇脱氢酶均具有一定程度的底物抑制和产物抑制,且反应需要添加昂贵的辅酶,不利于高浓度条件下实现酶法规模化制备(S)-NBHP。因此,筛选具有良好催化性能的醇脱氢酶(或酮还原酶)对实现高效酶法制备(S)-NBHP 具有重要意义。

作者对本实验室保存的还原酶库进行了筛选,旨在获得对 NBPO 具有优良催化性能的还原酶。该酶库中的还原酶具有 20%~50%的氨基酸序列同源性,并能够催化还原多种酮类物质。研究发现,来源 *Kluyveromyces polyspora* 的醇脱氢酶 KpADH 显示出较大的潜力,适用于酶法不对称合成(S)-NBHP。基于对不同反应体系的研究,解释了产物抑制的主要因素,并通过不添加任何助溶剂的单水相体系解除了产物抑制的影响,实现了无需额外添加辅酶 NADPH 的条件下(S)-NBHP 的高效和绿色合成。

1 材料与方法

1.1 实验材料

辅酶 NADPH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)、NADP⁺(氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)、NADH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)、NAD⁺(氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)等;购于深圳邦泰生物科技有限公司;质粒 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、 β -巯基乙醇、TEMED、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素(Kan)等;购于上海捷瑞生物工程有限公司;N-Boc-3-羟基哌啶:购于上海麦克林生物公司;N-Boc-3-哌啶酮:购于上海皓伯化工有限公司。

1.2 菌株

所有质粒均保存于江南大学生物工程学院生物催化与酶工程实验室还原酶文库,并在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中表达。

1.3 高通量活力测定方法

以 NBPO 作为底物,在 30 °C 下测定 340 nm 处 NAD(P)H 吸光度的变化,计算比活力。200 μ L 活力测定体系包括:10 μ L 粗酶液(适当稀释倍数),10 μ L NBPO(溶于乙醇,终浓度为 5 mmol/L),10 μ L NAD(P)H(终浓度为 1 mmol/L)和 170 μ L 磷酸缓冲液(100 mmol/L,pH 7.0)。一个酶活力单位(U)定义为在上述条件下每分钟氧化 1 μ mol NAD(P)H 所需的酶量。

1.4 分析方法

反应液用乙酸乙酯萃取,无水硫酸钠干燥,并通过真空蒸发器挥发乙酸乙酯。采用高效液相色谱法(HPLC)分析立体选择性及转化率。立体选择性分析采用 Superchiral S-AY 柱(4.6 mm \times 150 mm, Shanghai Chiralway Biotech Co.Ltd)测定,流动相为体积分数 95%的正己烷和体积分数 5%的乙醇。转化率分析使用 C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, Diamonsil,

Shanghai DIKMA Co. Ltd),流动相为体积分数 55% 的乙腈和体积分数 45% 的水。检测器波长均为 210 nm,柱温为 30 ℃。

1.5 蛋白质的表达及纯化

将含有 *KpADH* 重组质粒的大肠杆菌接种到 LB 培养基中,并加入 50 μg/mL 的卡那霉素(Kan),在 37 ℃和 180 r/min 下振荡培养。当 OD₆₀₀ 达到 0.8 时,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG, 0.2 mol/L)至终浓度 0.2 mmol/L,并将温度降低至 25 ℃诱导蛋白质表达。培养结束,通过离心收集细胞并在 PBS 缓冲液(pH 7.4)中进行超声破碎。将细胞裂解液以 8 000 r/min 离心 30 min。最后,通过亲和色谱法纯化细胞裂解液,并通过 SDS-PAGE 分析。

1.6 半衰期的测定

将 *KpADH* 的纯酶液稀释至 1 mg/mL 左右,取稀释的酶液 1 mL 放入 30 ℃恒温水浴锅中保温,定时取样并采用上述 1.3 的测活方法。以 0 h 的活力为 100%,依次测定比活力随时间变化的曲线,活力下降到 50% 的时间为该蛋白质在 30 ℃的半衰期。

1.7 产物抑制动力学测定

采用纯酶液测定 *KpADH* 的动力学参数,使用上述 1.3 的测活方法,测定不同浓度底物(0.5~50 mmol/L)和产物(0~100 mmol/L)的比活力,使用 Origin 软件分别进行非线性回归(nonlinear regression)拟合。拟合方程包括:米氏方程、竞争性抑制方程、非竞争性抑制方程、反竞争性抑制方程、混合性抑制方程;并获得参数抑制常数 K_i 、米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{max} ,采用 Origin 评估拟合结果并通过 MatLab 软件作图。以上所有数据均独立测定 3 次。

1.8 酶促不对称合成反应的条件优化

反应在 20 mL 的磁力搅拌夹套反应器中进行,将 1 g 底物、1.2 g 葡萄糖、20 mg 葡萄糖脱氢酶冻干酶粉、35 mg *KpADH* 冻干酶粉及不同助溶剂分别加入 10 mL 反应体系中,30 ℃恒温条件下反应,并采用自动滴定仪滴定 1 mol/L Na₂CO₃,使 pH 维持在 7.0。反应进程中定点取样,通过液相色谱分析获得转化率及终产物的对映体过量值(e.e.值)。

1.9 底物及产物分配系数的测定

准确配制 1 mol/L 的 NBPO 及 NBHP,取 20 μL 加入 480 μL 缓冲液中,再按照体积比 1:1 加入有机溶剂,吸取 200 μL 水相,加入 400 μL 乙酸乙酯萃

取并烘干,通过液相色谱分别计算出底物及产物的浓度。分配系数等于底物 NBPO 和产物 NBHP 分别在有机相和水相浓度的分配比。每个样品分别做 3 个平行。

1.10 有机溶剂耐受性的测定

将纯化的 *KpADH* 酶液(保持蛋白质质量浓度在 1 mg/mL 左右)与有机溶剂按体积比 1:1 混合,在 30 ℃和 1 000 r/min 条件下振荡并保温 12 h,吸取水相中的酶液采用 1.3 的测活方法,进行残余活力的测定。

1.11 克级制备(S)-NBHP

反应在 20 mL 的磁力搅拌夹套反应器中进行,将 2 g 底物、2.4 g 葡萄糖、40 mg 葡萄糖脱氢酶冻干酶粉、70 mg *KpADH* 冻干酶粉分别加入 10 mL 反应体系中,30 ℃恒温反应,并采用自动滴定仪滴定 1 mol/L Na₂CO₃,使 pH 维持在 7.0。反应结束后,采用二氯甲烷将反应液萃取 3 次,收集萃取后的二氯甲烷,并通过旋转蒸发器挥发二氯甲烷,获得产品(S)-NBHP。采用 HPLC 分析产品的立体选择性。

2 结果与讨论

2.1 醇脱氢酶的筛选

对酶库进行有针对性的筛选是获得新酶的有效途径之一。分别以 NADPH 和 NADH 为辅酶,以 *N*-Boc-3-哌啶酮(NBPO)为底物,在 340 nm 对实验室保存的还原酶库进行高通量活力筛选。通过筛选发现,对 NBPO 具有还原活力的还原酶均为 NADPH 依赖型。进一步对有活力的还原酶进行立体选择性分析,结果见表 1。经过活力的筛选得到 6 种对 NBPO 具有一定催化活力的还原酶,立体选择性较高的有 4 种:*KpADH*、CgKR1、PAR、Cg26。其中 Cg26 的立体选择性为 *R* 构型,其余 3 种为 *S* 构型。考虑到适用于大规模的酶法制备,一些商业参数指标需要参考,例如生物催化剂载量,其决定反应过程中酶制剂的经济效应。较高的比活力有利于生物催化剂在较低的载量下实现底物浓度载量上的生物转化数,从而实现经济高效的生物催化过程^[9]。同时,前期工作中获得了 *KpADH* 的晶体结构并对 *KpADH* 的立体选择性机制做了深入的分析,有利于后续的立体选择性改造^[10]。从表 1 来看,*KpADH* 较高的比活力在大规模的制备中更具有明显的优势。所以,选取来自 *Kluyveromyces polyspora* 的

表 1 醇脱氢酶库的筛选结果

Table 1 Screening results of alcoholdehydrogenases library

还原酶	辅酶	比活力/(U/mg)	e.e./%	来源
<i>KpADH</i>	NADPH	5.68±0.21	97.0 (S)	<i>Kluyveromyces polyspora</i>
<i>CgKR1</i>	NADPH	0.38±0.01	99.0 (S)	<i>Candida glabrata</i>
PAR	NADPH	0.18±0.02	99.0 (S)	<i>Corynebacterium sp. ST-10</i>
<i>Cg26</i>	NADPH	0.17±0.01	99.0 (R)	<i>Candida glabrata</i>
<i>RpCR</i>	NADPH	0.06±0.00	9.9 (R)	<i>Rhodococcus sp. p52</i>
<i>CgKR2</i>	NADPH	0.03±0.01	82.7 (R)	<i>Candida glabrata</i>

KpADH 为后续研究对象^[11]。

2.2 不同底物浓度对转化率的影响

具有应用前景的生物催化反应通常底物上载量应大于 100 g/L,故首先考察了 *KpADH* 对高浓度 NBPO 的耐受情况。根据文献报道,NBPO 为疏水性底物^[12]。因此,在 10 mL 的反应体系中加入 5% 的乙醇助溶,并加入相同的酶量(200 U)考察不同底物浓度对反应的影响。如图 1 所示,随着反应时间的增加,转化率快速趋于稳定。当底物浓度为 250 mmol/L 时,反应可实现完全转化,然而在底物浓度分别为 500 mmol/L 和 1 mol/L 时,底物的转化水平分别为 390 mmol/L 和 460 mmol/L。底物浓度较高的两个反应都快速终止在 400 mmol/L 的转化水平,且延长反应时间后转化率并未得到改善。测定 30 °C *KpADH* 的半衰期为 80 h,说明 *KpADH* 的稳定性良好。但在加入底物反应 1 h 左右,反应快速终止在 400 mmol/L 的转化水平,说明反应过程中较高的底物或产物浓度抑制了 *KpADH* 合成产物(S)-NBHP。该现象与之前报道的 YDR541C 在单水相催化中受到严重的抑

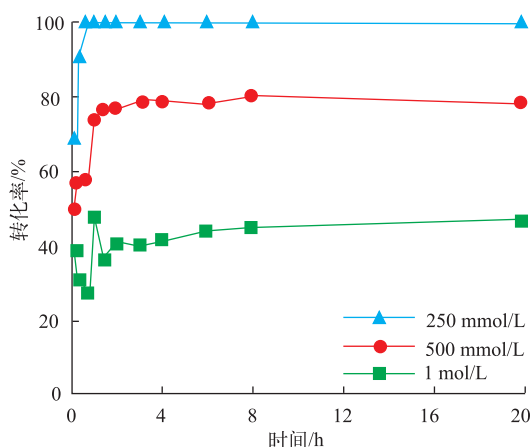


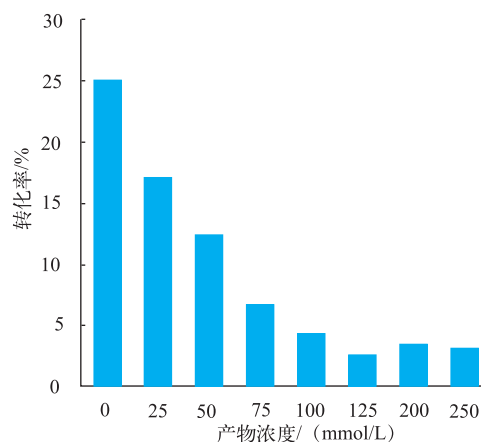
图 1 不同底物浓度的反应转化曲线

Fig. 1 Reaction conversion curves at different substrate concentrations

制结果一致^[13],说明可能是产物抑制导致的。因此,作者考察不同浓度的产物对不对称还原反应的影响。

2.3 不同产物浓度对转化率的影响

在 1 mL 反应体系中加入相同酶量(0.015 U)、相同的底物浓度(50 mmol/L NBPO)和不同的产物浓度(0~250 mmol/L NBPH),考察不同产物浓度对 *KpADH* 催化还原 NBPO 反应的影响,结果见图 2。随着产物浓度的增加,反应转化率逐渐降低,直到反应转化率接近 3%,说明产物抑制是影响 NBPO 转化反应的关键因素。

图 2 不同浓度产物对 *KpADH* 催化 NBPO 还原反应转化率的影响Fig. 2 Effect of different product concentrations on the bioreduction of NBPO catalyzed by *KpADH*

2.4 底物和产物抑制动力学拟合分析

分别考察了不同浓度的底物和产物存在的条件下 *KpADH* 比活力的变化,并通过拟合获得相应的动力学常数,见图 3。经过底物动力学测定,在高浓度底物的条件下 *KpADH* 的活力没有明显降低, K_m 值为 (17.4±1.1) mmol/L, V_{max} 值为 (88.3±2.2) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,未发现明显底物抑制的现象。在加

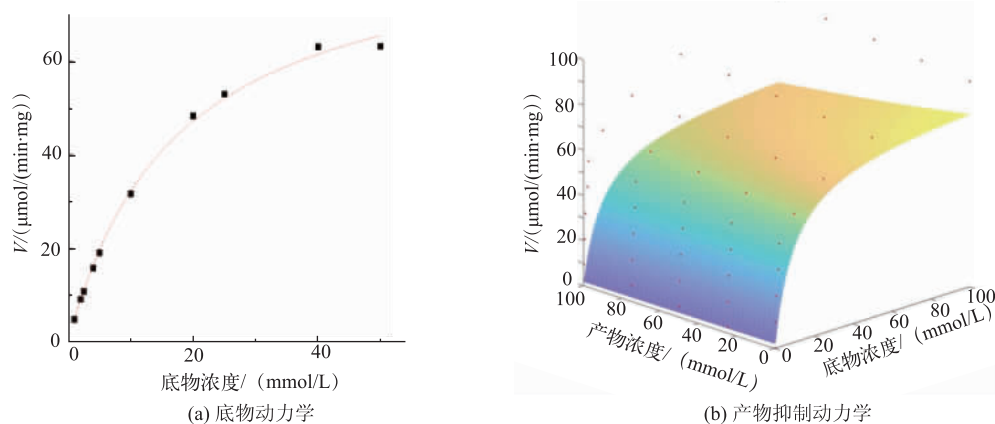


图3 底物和产物动力学的拟合结果

Fig. 3 Fitting results of the substrate and product kinetics

入不同浓度的产物后, K_pADH 的比活力呈现不同程度降低, 见图 3(b) 的拟合曲线。通过抑制动力学拟合分析和 Origin 软件评估拟合结果, 非竞争性抑制方程的拟合程度最高, R -Square 值高达 0.98 (R -Square 越接近 1, 说明拟合程度越高)。获得抑制常数 K_i 值为 (459.9 ± 118.6) mmol/L, K_m 值为 (9.9 ± 1.0) mmol/L, V_{max} 值为 (83.9 ± 2.9) $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。上述反应体系中加入助溶剂乙醇以增加产物的水溶性, 当达到产物的抑制浓度后反应受到抑制而进入平台期。

经过拟合评估, 该抑制类型属于非竞争性抑制。这说明产物与酶的非活性部位相结合, 形成产物和酶的络合物后会进一步再与底物结合; 或者是酶与底物结合形成底物和酶络合物后, 部分再与产物结合。虽然底物、抑制物(产物)和酶的结合无竞争性, 但两者与酶结合所形成的中间络合物不能释放产物, 导致了酶催化的表现反应速率降低。

据报道, NADPH 依赖性的羰基还原酶 YDR541C 在单水相反应体系中进行 NBPO (100 ~ 400 mmol/L) 的不对称转化, 300 mmol/L 的 NBPO 可以在 1 h 内完全转化, 由于产物抑制作用, 400 mmol/L 的 NBPO 转化率仅为 81.7%。最终反应停留在 300 mmol/L 的转化水平^[13]。与还原酶 PsCR 一样, 在单水相体系中将 4-氯-3-氧代丁酸乙酯(COBE) 不对称催化还原为(S)-4-氯-3-羟基丁酸酯((S)-CHBE), 当产物浓度达到 120 mmol/L 时, 反应速度急剧下降^[14]。作者通过动力学拟合分析, 当达到抑制浓度 400 mmol/L 时, 产物与底物非竞争性地结合 K_pADH 形成三元复合物, 使 K_pADH 构象改变, 不

能进一步释放产物, 导致酶活力下降。这种非竞争性抑制作用不能通过增加底物浓度来解除抑制^[15]。因此, 在不同的底物浓度下 K_pADH 的转化水平停留在 400 mmol/L。

2.5 单水相催化体系的探索

据报道, 反应体系中添加助溶剂可能影响产物的转化率和立体选择性^[16-17]。由于 K_pADH 还原 NBPO 的 e.e. 值为 97%, 因此通过溶剂的优化可能提高终产物的立体选择性和反应转化率。作者针对单水相体系和水-有机两相体系进行了研究, 根据不同底物浓度的研究结果, 固定 500 mmol/L 的底物浓度, 保持底物与酶添加量的质量比(S/C)为 18.2:1 的条件下, 选择不同的醇类助溶剂、有机溶剂以及绿色离子液体 $BMIN \cdot PF_6$ 进行体系的优化^[18-19]。

如表 2 所示, 反应体系 2、3、4 中分别加入体积分数 5% 醇类助溶剂, 可以看出助溶剂虽然提高了反应的初速率, 但是反应很快就在转化率为 60% 左右时终止, 这是产物抑制导致的。反应 5 中加入 5% 的乙酸丁酯, 最终转化率达到 98.2%。由于乙酸丁酯的疏水性使得产物空间上与酶分离, 因而转化率得以提升, 但也限制了酶与剩余底物的充分接触, 最终使得反应在 24 h 的转化率未达到 99% 以上。少量有机溶剂的添加对 e.e. 值没有影响。综上, 其中最佳的反应体系为不加任何助溶剂的磷酸盐缓冲液体系, 在该体系中, 反应转化率可以达到 99% 以上。

2.6 两相催化体系的探索

采用水-有机溶剂的两相体系可实现底物与酶、产物与酶在空间上的相对分离, 从而避免酶失活。底物 NBPO 是疏水性底物, 略微溶于水, 不利于

表 2 KpADH 单相反应体系的优化结果

Table 2 Optimization results of KpADH imonoaqueous phase reaction system

序号	缓冲液	溶剂	NADP ⁺ 浓度/(mmol/L)	时间/h	转化率/%	e.e./%
1	PBS 7.0	—	0	12	99.1	97.1(S)
2	PBS 7.0	5% 乙醇	0	1	62.6	97.0(S)
3	PBS 7.0	5% 甲醇	0	1	47.5	97.2(S)
4	PBS 7.0	5% 异丙醇	0	1	48.5	97.5(S)
5	PBS 7.0	5% 乙酸丁酯	0	24	98.2	97.2(S)

注: 时间为反应终止、转化率不再发生变化的时间。反应体系为 10 mL, 底物浓度为 500 mmol/L, 包含 1.2 g 葡萄糖, 35 mg KpADH 冻干酶粉和 20 mg BmGDH 冻干酶粉。

与酶分子充分接触。此外, 底物对酶分子有一定毒性, 这也会导致酶分子的失活, 因此尝试两相反应体系实现油—水的界面反应。作者选取了具有不同 $\lg P$ 值的 10 种有机溶剂进行探究, 分别测定了产物和底物在有机溶剂中的分配系数以及有机溶剂对 KpADH 催化活性的影响, 结果见表 3—4。最终选择产物分配系数分别为 3.6 和 15.8 以及残余活力分别为 91% 和 5% 的有机溶剂: 甲苯和乙酸丁酯。反应体系 6 和 7 表明, 50% 有机溶剂的加入使 e.e. 值提高至 98.9%, 这表明酶在有机溶剂中刚性增强, 构象更加稳定^[7]。但是, 两相反应体系的转化率均没有达到 99% 的水平, 且反应速率较慢, 说明大量的底物溶解在有机溶剂中减少了酶与其碰撞的机会, 所以反应速率下降, 尤其是在反应后期底物较少的情况下, 无法与酶充分接触, 导致反应不完全。

据报道, 离子液体作为一种绿色溶剂可被用作反应介质增强传质效率和提高酶的稳定性^[20-22]。因此, 选取常用的离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐(BMIN·PF₆)以及实验室合成的低共熔溶剂氯化胆碱: 尿素摩尔比为 1:2、氯化胆碱: 甘油摩尔比为 1:1、氯化胆碱: 葡萄糖摩尔比为 5:2 来探索反应的转化率和对映选择性。然而, KpADH 在上述离子液体和低共熔溶剂(DES)中活力较低, 仅观察到较低的转化率。

2.7 克级制备(S)-NBHP

从上述反应体系优化的结果可知, 未加入任何助溶剂的反应体系 1 可在 24 h 内催化还原 500 mmol/L NBPO, 达到 99.6% 的转化率, 见图 4。说明在该反应过程中, 底物 NBPO 逐渐溶解并完全转化为产物(S)-NBHP, 且产物难溶于水相体系, 避免了与酶的大量接触, 未对酶活产生显著影响。加入助溶剂后, 反应初速度加快, 但增加了产物的溶解

表 3 有机溶剂对 KpADH 活力的影响及产物和底物的分配系数

Table 3 Effect of organic solvents on KpADH activity and partition coefficient of products and substrates

体积分数为 50% 的有机溶剂	$\lg P$	相对活力/%	分配系数	
			NBPO	NBHP
PBS 7.0(对照)	—	100	—	—
甲苯	2.5	90.7±1.7	16.0	3.6
正庚烷	4.0	86.8±1.8	1.0	0.1
异辛烷	4.5	93.4±3.3	1.6	0.2
正己烷	3.5	96.5±4.7	2.1	0.2
环己烷	3.2	96.7±5.3	3.3	0.4
邻苯二甲酸二丁酯	4.8	< 0.1	—	—
乙酸丁酯	1.8	5.4±0.4	18.2	15.8
二氯甲烷	1.4	< 0.1	35.5	83.6
乙酸乙酯	0.7	< 0.1	54.5	12.9
丙酮	-0.2	< 0.1	—	—

表 4 两相反应体系的优化结果

Table 4 Optimization results of biphasic reaction system

序号	缓冲液	溶剂	NADP ⁺ 浓度/(mmol/L)	时间/h	转化率/%	e.e./%
6	PBS 7.0	50% 甲苯	0	8	92.8	98.9(S)
7	PBS 7.0	50% 乙酸丁酯	0	12	97.6	98.4(S)
8	PBS 7.0	50% BMIN·PF ₆	0	6	63.3	97.0(S)

注: 时间为反应终止、转化率不再发生变化的时间; 反应体系为 10 mL, 底物浓度为 500 mmol/L, 包含 1.2 g 葡萄糖, 35 mg KpADH 冻干酶粉和 20 mg BmGDH 冻干酶粉。

度, 使之达到抑制浓度(459.9±118.6) mmol/L, 所以反应快速终止。另外, 与两相体系相比, 大量有机溶

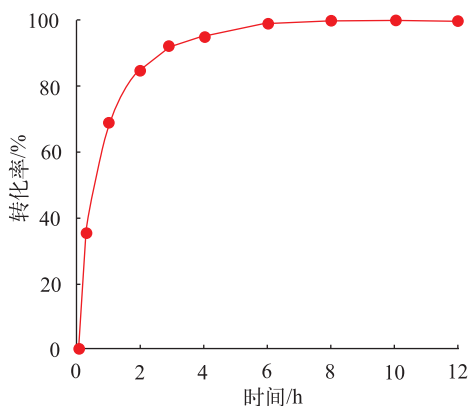


图4 $KpADH$ 不对称还原 200 g/L NBHO 的反应进程

Fig. 4 Conversion curve of the asymmetric reduction of NBPO by $KpADH$ at 200 g/L

剂的加入可以略微提高产物的 e.e. 值,但转化不完全会影响终产物的纯度。所以,不加任何助溶剂的磷酸盐缓冲液体系更具备绿色、高效的生物催化制备条件。

因此,在反应体系 1 的基础上保持底物与酶添加量的质量比(S/C)为 18.2 g/g 不变,逐渐增加底物的质量浓度至 200 g/L(1 mol/L),最终反应 12 h,可实现完全转化,产物的 e.e. 值为 97%,产品收率为

77%。与来源于酿酒酵母的羧基还原酶 YDR541C 催化合成(S)-NBHP 相比, $KpADH$ 能够在不加任何有机溶剂和外源辅酶的条件下实现较高浓度的转化,表明 $KpADH$ 在酶法制备(S)-NBHP 上具有良好的应用潜力^[13]。

3 结语

作者筛选和比较发现 $KpADH$ 可以高效还原 NBPO 合成(S)-NBHP。通过反应体系的探索,发现在加入乙醇等助溶剂的反应体系中有较强的抑制效应,且高浓度的产物 NBHP 对 $KpADH$ 催化性能影响显著。通过动力学拟合,发现抑制类型为非竞争性抑制类型,并计算获得抑制常数 K_i 值为 (459.92 ± 118.59) mmol/L。反应体系优化的结果说明,不添加任何助溶剂的体系能够有效地避免产物抑制,同时也能使酶与底物充分接触,反应完全。在此基础上实现了 200 g/L 底物的完全转化,克级制备获得了(S)-NBHP。作者初步探究了 NBHP 对醇脱氢酶的抑制机制,并优化和建立了解决抑制问题的反应体系,为实现(S)-NBHP 的大规模酶法合成奠定了良好的研究基础。

参考文献:

- [1] ADAMS J P, BROWN M J B, DIAZ-RODRIGUEZ A, et al. Biocatalysis: a pharma perspective[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(11): 2421-2432.
- [2] NGUYEN L A, HE H, PHAM-HUY C. Chiral drugs: an overview[J]. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 2006, 2(2): 85-100.
- [3] BROWN J R. Ibrutinib (PCI-32765), the first BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) inhibitor in clinical trials[J]. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2013, 8(1): 1-6.
- [4] BURGER J A. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape[J]. *Current Opinion in Oncology*, 2012, 24(6): 643-649.
- [5] BYRD J C, FURMAN R R, COUTRE S E, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2013, 369(1): 32-42.
- [6] HUGHES D L. Patent review of manufacturing routes to recently approved oncology drugs: ibrutinib, cobimetinib, and alectinib [J]. *Organic Process Research & Development*, 2016, 20(11): 1855-1869.
- [7] REDDY M S, NARENDER M, RAO K R. A new asymmetric synthetic route to substituted piperidines[J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(2): 331-336.
- [8] JU X, TANG Y, LIANG X, et al. Development of a biocatalytic process to prepare (S)-N-Boc-3-hydroxypiperidine[J]. *Organic Process Research & Development*, 2014, 18(6): 827-830.
- [9] STEPHAN L, LORI G, JAMES L. Engineered enzymes for chemical production[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 101(4): 647-653.
- [10] ZHOU J, WANG Y, XU G, et al. Structural insight into enantioselective inversion of an alcohol dehydrogenase reveals a "polar

- gate” in stereorecognition of diaryl ketones[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2018, 140(39): 12645-12654.
- [11] TANG M H, XU G C, NI Y. Genome mining and characterization of diaryl ketone reductase from *Kluyveromyces polysporus* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2018, 37(3): 240-249.
- [12] XU G, WANG H, WU Z. Efficient bioreductive production of (S)-N-Boc-3-hydroxypiperidine using ketoreductase ChKRED03 [J]. **Process Biochemistry**, 2016, 51(7): 881-885.
- [13] CHEN L, FAN H, ZHANG Y, et al. Development of a practical biocatalytic process for (S)-N-Boc-3-hydroxypiperidine synthesis [J]. **Tetrahedron Letters**, 2017, 58(16): 1644-1650.
- [14] QI Y, CAO H, YAN M, et al. Construction and co-expression of a polycistronic plasmid encoding carbonyl reductase and glucose dehydrogenase for production of ethyl(S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate[J]. **Bioresource Technology**, 101(17): 6761-6767.
- [15] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(第三版上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 368-369.
- [16] GUO W, LIU X, LIU Y, et al. Chiral catalysis at the water/oil interface[J]. **ACS Catalysis**, 2017, 8(1): 328-341.
- [17] STEPANKOVA V, BIDMANOVA S, KOUDELAKOVA T, et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents[J]. **ACS Catalysis**, 2013, 3(12): 2823-2836.
- [18] LEE S H, DOAN T T N, HA S H, et al. Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2007, 45(1-2): 57-61.
- [19] LEE J K, KIM M. Ionic liquid-coated enzyme for biocatalysis in organic solvent[J]. **The Journal of Organic Chemistry**, 2002, 67(19): 6845-6847.
- [20] XU P, XU Y, LI X, et al. Enhancing asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 cells by using deep eutectic solvents as cosolvents[J]. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2015, 3(4): 718-724.
- [21] PAIVA A, CRAVEIRO R, AROSO I, et al. Natural deep eutectic solvents-solvents for the 21st century[J]. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2014, 2(5): 1063-1071.
- [22] DREYER S, KRAGL U. Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2008, 99(6): 1416-1424.

科技信息

欧盟更新批准里氏木霉 CBS 122001 生产的 6-植酸酶制剂作为饲料添加剂

据欧盟官方公报消息, 2021 年 6 月 17 日, 欧盟委员会发布法规 (EU) 2021/982 号条例, 根据欧洲议会和理事会法规 (EC) No 1831/2003, 欧盟更新批准里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) CBS 122001 生产的 6-植酸酶制剂作为猪和家禽的饲料添加剂。

根据附件中规定的条件, 这种添加剂被授权作为动物添加剂的所属类别为“动物技术添加剂”, 功能组别为“消化增强剂”。授权结束日期为 2031 年 7 月 8 日。本条例自发布之日起第二十天生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟更新批准里氏木霉 CBS 122001 生产的 6-植酸酶制剂作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2021-6-21). <http://news.foodmate.net/2021/06/597179.html>