

双芳基酮还原酶的基因挖掘及催化性质

唐铭烔^{1,2}, 许国超^{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: 通过基因挖掘, 获得了来源于 *Kluyveromyces polysporus* 的醇脱氢酶基因 *kpadh*, 并在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中实现了可溶性表达。其编码的醇脱氢酶 *KpADH* 属于短链脱氢酶家族, 可催化双芳基酮不对称还原生成手性双芳基醇, 且可利用异丙醇为辅底物进行底物偶联型辅因子循环。采用 Ni-NTA 亲和层析柱对重组蛋白 *KpADH* 进行纯化, 并研究了酶学性质。研究发现: *KpADH* 的还原和氧化反应的最适 pH 分别为 5.5 和 9.5; *KpADH* 对 1-(4'-氯苯基)-(吡啶-2'-基)-甲酮 [1-(4'-chlorophenyl)(pyridin-2'-yl)methanone, CPMK] 的 K_m 和 V_{max} 为 0.500 mmol/L 和 25.0 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, 对辅底物异丙醇的 K_m 和 V_{max} 分别为 6.36 mmol/L 和 21.4 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$; *KpADH* 对酮酯类底物和 2,3-丁二醇有较高的催化活力。运用该重组菌对 100 mmol/L 的 CPMK 进行不对称还原, 反应 10 h 后, 底物转化率大于 99.8%, 产物 (R)-CPMA 的 *ee* 值为 82%, 摩尔收率 88.7%。本研究为利用醇脱氢酶 *KpADH* 高效合成光学纯 CPMA 奠定了基础。

关键词: 基因挖掘; 双芳基酮还原酶; *KpADH*; (R)-CPMA; 性质表征

中图分类号: Q 554; Q 781 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)03-0240-10

Genome Mining and Characterization of Diaryl Ketone Reductase from *Kluyveromyces polysporus*

TANG Minghui^{1,2}, XU Guochao^{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: In this study, an alcohol dehydrogenase *KpADH* from *Kluyveromyces polysporus* was identified by genome mining strategy. This newly mined *KpADH* belongs to extended SDRs subfamily, and catalyze the asymmetric reduction of diaryl ketones into chiral diaryl alcohols. *KpADH* also displays substrate-coupled NADPH recycling ability by oxidation of cosubstrate isopropanol. The recombinant *KpADH* was purified by Ni-NTA affinity chromatography, and the enzymatic properties of the purified *KpADH* were characterized. The optimum pH of oxidizing and reducing activity is 9.5 and 5.5 respectively. The K_m and V_{max} of *KpADH* towards CPMK are 0.5 mmol/L and 25 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ respectively, while the K_m and V_{max} of *KpADH* towards isopropanol are 6.36 mmol/L and 21.37 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ respectively. *KpADH* shows higher catalytic activity on

收稿日期: 2015-10-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(21276112); 国家 973 计划项目(2011CB710800); 教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-11-0658)。

* 通信作者: 倪 晔(1975—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 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

引用本文: 唐铭烔, 许国超, 倪晔. 双芳基酮还原酶的基因挖掘及催化性质[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(03): 240-249.

ketone esters and 2,3-butanediol. Within 10 h, 100 mmol/L CPMK was asymmetrically reduced into (*R*)-CPMA by recombinant *E. coli* BL21/pET28a-*kpadh* cells, giving >99% conversion, 82% ee and 88.7% molar isolation yield. This study provides useful guidance for the application of this newly identified *KpADH* in the preparation of chiral diaryl alcohols.

Keywords: genome mining, diaryl ketone reductase, *KpADH*, (*R*)-CPMA, enzymatic characterization

(*R*)-(4'-氯苯基)-(吡啶-2'-基)-甲醇[(*R*)-(4'-chlorophenyl) (pyridin-2'-yl)methanol, (*R*)-CPMA, C₁₂H₁₀ClNO]是一类重要的手性双芳基甲醇,可作为关键手性中间体用于合成治疗梅尼埃综合症、血管性头痛、脑动脉硬化及急性缺血性脑血管等疾病的药物,如抗组胺药倍他司汀。鉴于手性(*R*)-CPMA 和双芳基甲醇广泛的应用价值,其高效、绿色地合成具有非常重要的意义。目前手性双芳基甲醇的合成方法主要有对映选择性拆分法、亲和加成法和生物不对称还原法,而由于生物不对称还原法具有 100%的理论得率、操作简便、反应条件温和等特点被认为是最具应用潜力的合成方法之一^[1-3]。

Corey EJ 等^[4]发现 CBS (Corey-Bakshi-Shibata) 还原剂可用于双芳基甲酮底物的不对称还原,生成手性双芳基甲醇,该法是目前为止具有最高对映选择性的化学还原法。在-40 ℃条件下,手性硼杂恶唑烷(CBS 催化剂)和儿茶酚硼烷的甲苯溶液可还原 1-(4'-氯苯基)-(吡啶-2'-基)-甲酮(CPMK)生成(*R*)-CPMA,最终反应转化率为 78%,*ee* 值为 98%。但该方法反应温度条件苛刻,对底物的要求高,才会具有高选择性,因此适用范围非常有限^[1]。2007 年,Truppo MD 等筛选了一系列商品化酮还原酶 KRED 后,发现虽然有一些 KRED 对双芳基酮底物有还原能力,但立体选择性一般,仅 KRED124 可以不对称还原 10 g/L 的 CPMK 生成(*R*)-CPMA,*ee* 值为 94%,转化率 98%^[5];2009 年,Zhu DM 等发现来源于 *Sporobolomyces salmonicolor* 的重组羧基还原酶 SSCR 及其突变体可以立体选择性还原不同双芳基酮底物 (8-99% *ee*)^[6-7],在葡萄糖脱氢酶的协助下,可还原 1-(4'-氯苯基)-1-苯基甲酮生成 1-(4'-氯苯基)-1-苯基甲醇,转化率为 62%,对映选择性为 88%(*R*);2012 年,本研究室周婕好等^[8-9]通过传统富集培养筛选到一株克鲁维酵母 *Kluyveromyces* sp. CCTCCM2011385,可催化还原 CPMK 生成(*S*)-CPMA (87% *ee*),然而野生菌全细胞最高仅能催化 2

g/L CPMK 的转化反应。

作者采用基因组数据挖掘的策略,克隆了 9 个不同来源的假定双芳基酮还原酶。经功能筛选发现来源于克鲁维多孢酵母 *Kluyveromyces polysporus* 的羧基还原酶 *KpADH* 对 CPMK 具有最高的催化活性和对映选择性,且该酶可用异丙醇为辅底物实现自身底物偶联型辅因子循环。为了更好的应用 *KpADH*,作者对重组 *KpADH* 进行纯化,研究了该酶的最适温度、最适 pH、金属离子依赖性、有机溶剂耐受性、底物特异性和酶动力学参数等酶学性质,并考察了重组菌在生物催化 CPMK 不对称还原上的效果,对进一步利用双芳基酮还原酶 *KpADH* 合成手性双芳基仲醇具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 本研究所用到的菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用到的菌株及载体

Table 1 Lists of microorganism strains and vectors used in the study

菌株、基因组或载体	用途	来源
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	羧基还原酶来源	作者所在实验室保藏
<i>Kluyveromyces polysporus</i>	羧基还原酶来源	作者所在实验室保藏
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	羧基还原酶来源	作者所在实验室保藏
<i>Streptomyces albus</i> J1074	羧基还原酶来源	作者所在实验室保藏
<i>Thermobifida fusca</i>	羧基还原酶来源	作者所在实验室保藏
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	羧基还原酶来源	作者所在实验室保藏
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	表达宿主	作者所在实验室保藏
pET28a	表达载体	购自 Novagen

1.1.2 引物 本研究用到的引物见表 2。

1.1.3 培养基 LB 培养基(g/L):酵母提取物 5;胰蛋白胨 10,氯化钠 10;pH 7.0,121 ℃灭菌 20 min。固体培养基则添加 2 g/dL 的琼脂。

表 2 基因挖掘实验所用引物
Table 2 Primers used in genome mining.

引物名称	引物序列(5'→3')	酶切位点
CR1f	CCATATGCCTGCTACTTTACATG	<i>Nde</i> I
CR1r	CGGGATCCCTTGAATACTTCGAAAG	<i>Bam</i> H I
CR2f	CTAGCTAGCATGCCTGCTACGTAAAG	<i>Nhe</i> I
CR2r	CGCTCGAGTTGGAATTTGGGAAG	<i>Xho</i> I
CR3f	CCATATGAGAGCTTTGGCATATTTTC	<i>Nde</i> I
CR3r	CGGATCCCTTCATTTACCGTGAT	<i>Bam</i> H I
CR4f	CGCCATATGACTACTGATACCACTG	<i>Nde</i> I
CR4r	CGGGATCCGGCTTCATTTTGAAGT	<i>Bam</i> H I
CR5f	CGCCATATGCTCTAATACAGTTCTAG	<i>Nde</i> I
CR5r	CGGGATCCTAATCTGTTCTGCTTCT	<i>Bam</i> H I
CR6f	CCCATATGACTACTGAAAAACCG	<i>Nde</i> I
CR6r	CGGGATCCGCTTTTACTTTGAAGT	<i>Bam</i> H I
CR7f	GGAATTCATATGACCACCGCTTTGTGT	<i>Nde</i> I
CR7r	CGCGGATCCATTTCTAAGATCCTCC	<i>Bam</i> H I
CR8f	CTAGCTAGCATGTCCAAACTACAG	<i>Nhe</i> I
CR8r	CGCGGATCCTTTATTGGCTCTGATC	<i>Bam</i> H I
CR9f	GGAATTCATATGAGCGTATTAATTAGT GG	<i>Nde</i> I
CR9r	CGCGGATCCAACCTCTACCTTCTTTAT	<i>Bam</i> H I

1.1.4 试剂 T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde*I、*Bam*H I、prime star DNA 聚合酶、protein molecular marker: 购于大连宝生物; 2×Taq DNA 聚合酶: 购于杭州宝赛生物工程有限公司; DNA marker、质粒及基因组提取试剂盒、胶回收及 PCR 产物纯化试剂盒: 购于上海捷瑞生物工程有限公司; NADPH 及 NADP⁺: 购于 Roche; 发酵培养基各种成分: 购自国药集团药业股份有限公司; IPTG、卡那霉素: 购于生工生物(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因序列的扩增 按照酵母及细菌基因组 DNA 抽取试剂盒(上海生工生物有限公司)说明书提取各菌株的基因组, 并以此为模板, 添加表 1 所示引物进行 PCR 扩增, 反应体系为: dNTP mix 4 μL, 5× prime star buffer 10 μL, 引物 1 (10 μmol/L) 1 μL, 引物 2 (10 μmol/L) 1 μL, 模板 10~50 ng, DNA polymerase 0.5 μL, ddH₂O 补足到 50 μL。PCR 的扩增程序为: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 10 s,

55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min 10 s, 循环 25 次, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.2.2 重组质粒的构建与大肠杆菌基因工程菌的构建 目的基因与表达载体 pET-28a 同时进行双酶切。酶切体系为: 目的基因/质粒 1 000 ng, 10×K buffer 10 μL, *Nde* I (10 U/L) 2 μL, *Bam*HI (10 U/L) 2 μL, ddH₂O 补足到 100 μL。将上述反应液混合均匀, 于 37 °C 酶切完全。参照核酸胶回收试剂盒说明书回收酶切后的目的基因和 pET28a, 然后用 T4 连接酶连接, 连接体系为: T4 连接酶 (5 U/L) 1 μL, 10×Ligation buffer 1 μL, 线性化 pET28a 50 ng, 目的基因 100 ng, ddH₂O 补足到 20 μL。反应液混合均匀, 16 °C 连接 10 h。将连接产物转入感受态 *E. coli* BL21(DE3) 中, 将后培养液均匀涂布于含有卡那霉素的固体平板上, 于 37 °C 倒置培养 12 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证, 选择阳性克隆进行培养及测序验证。

1.2.3 培养条件、粗酶液的制备、蛋白质纯化及酶活测定 将上述菌种接种至 30 mL 培养基中, 于 37 °C, 180 r/min 振荡培养, 待 OD₆₀₀ 达 0.6 时加入 30 μL IPTG 诱导 (IPTG 浓度为 100 mmol/L), 于 30 °C 继续振荡培养 5 h。在 4 °C 和 8 000 g 条件下离心 5 min, 倒掉上清液, 向菌体中加入 10 mL 的磷酸钾缓冲液 (100 mmol/L, pH 7.0), 使用超声波破碎仪破碎细胞 (功率 285 W, 工作 1 s, 间歇 3 s, 10 min)。取其中 1 mL 进行 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 (粗酶液) 进行酶活测定。重组 KpADH 蛋白的纯化方法参见前期报道^[10-11]。

还原活力测定方法: 总反应体系为 200 μL, 包括 0.5 mmol/L NAD(P)H, 0.5 mmol/L CPMK, 磷酸钾缓冲液 (KPB, 100 mmol/L, pH 5.5), 充分混匀, 30 °C 保温 2 min, 加入 10 μL 合适浓度的酶液, 检测 340 nm 下吸收值的变化。酶活力单位 (U) 定义为: 在上述条件下, 每分钟催化氧化 1 μmol NAD(P)H 所需要的酶量。

氧化活力测定方法: 总反应体系为 200 μL, 包括 5 mmol/L NAD(P)⁺, 10 mmol/L 异丙醇, 磷酸钾缓冲液 (KPB, 100 mmol/L, pH 10.0), 充分混匀, 30 °C 保温 2 min, 加入 10 μL 合适浓度的酶液, 检测 340 nm 下吸收值的变化。酶活力单位 (U) 定义为: 在上述条件下, 每分钟催化还原 1 μmol NAD(P)⁺ 所需要的酶量。

$$\text{酶活力(U)计算公式: } (U) = \frac{EW \times V \times 10^3}{6\ 220 \times l}$$

其中,EW 为 1 min 内 340 nm 处吸光值的变化;V 为反应液的总体积 (mL);6 220 为摩尔消光系数 (L/(mol·cm));l 为光程距离(cm)。

蛋白质含量测定采用 Bradford 法,以小牛血清白蛋白 BSA 为标准品^[12]。

酶比活力计算公式:

$$\text{比活力(U/mg)} = \frac{\text{酶活力(U)}}{\text{蛋白质质量(mg)}}$$

1.2.4 全细胞水相催化及检测 将 30 mL 诱导后的重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*kpadh* (OD₆₀₀ 约为 5), 充分重悬于 9.5 mL 磷酸钠缓冲液 PBS (100 mmol/L, pH 8.0), 于 20 mL 的反应器中加入 100 mmol/L 的 NADP⁺ 10 μL, 500 mmol/L 的 CPMK (溶解于异丙醇) 500 μL, 总体积为 10 mL。将上述反应体系置于 30 °C, 180 r/min 振荡反应直至反应结束。每隔一段时间取样 100 μL, 加入 400 μL PBS (100 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液和 500 μL 乙酸乙酯萃取, 取出上层有机相, 待有机相自然挥发完全, 加入 500 μL HPLC 级的乙醇, 进行正相 HPLC 检测。

通过正相 HPLC 分析 CPMK 转化率和 (R)-CPMA 的对映选择性, 具体方法为: Agilent 1100 HPLC (美国), Chiralcel OB-H (0.46 mm×250 mm×5 μm) 色谱柱, 流动相为含有 0.1% 乙醇胺的正己烷: 乙醇 (体积比 95:5), 流速 1.0 mL/min, 254 nm, 柱温 30 °C, (S)-和 (R)-CPMA 的保留时间分别为 8.2、9.0 min。ee 值计算公式:

$$ee = \frac{A_R - A_S}{A_R + A_S} \times 100\%$$

式中, A_R 为 (R)-CPMA 的峰面积; A_S 为 (S)-CPMA 的峰面积。

2 结果与讨论

2.1 基因挖掘、重组菌株的构建及筛选

来源于近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) 的醇脱氢酶 CpSADH, 具有广泛的底物谱, 可以催化多种潜手性羰基化合物的不对称还原, 可还原 76.6 g/L 的 1,3-丁二酮为 (R)-1,3 丁二醇 (95% ee)^[13-14], 对苯乙酮、丁酮和酮酯等底物也有很高的还原活力, 因此我们推测其底物结构口袋较大, 可以容纳双芳基酮类底物。更重要的是 CpSADH 具有底物偶

联辅因子再生的活性, 可利用异丙醇为辅底物实现 NADPH 的原位再生^[14]。具备底物偶联的辅因子再生的羰基还原酶可单独实现不对称还原反应的进行和辅因子再生, 无需外源辅因子再生系统如葡萄糖脱氢酶等的协助, 避免了双酶的比例不匹配等不足, 降低催化剂的制备成本, 受到生物还原法的青睐。在酶的基因挖掘中, 序列相似性在 30%~70% 的基因通常既保留了一部分与探针酶相似的功能, 又具有一定的特异性。因此本研究选用 CpSADH 作为基因挖掘的探针酶, 将其蛋白质序列在 NCBI 数据库中比对后选取 9 个未经报道且与探针序列相似性为 34%~65% 的基因进行表达和筛选, 见表 3。

按照方法 1.2.1 和 1.2.2 成功将 9 个基因从基因组上进行扩增, 并连接到表达载体 pET28a, 将重组载体热转入 *E. coli* BL21 (DE3), 成功构建重组菌。按照方法 1.2.3 对重组菌进行摇瓶培养, 诱导产酶, 并结合 SDS-PAGE 分析和酶活力分析对假定羰基还原酶进行功能筛选。仅有来源于 *K. polysporus* 的 CR1 可以检测到对 CPMK 有明显的还原活力 (1.4 U/mg), 并且 CR1 还可氧化异丙醇 (0.40 U/mg)。因此 CR1 是一个具有底物偶联辅因子再生能力的双芳基酮还原酶, 并将其命名为 *KpADH*, 其编码基因为 *kpadh*。为了进一步拓展其在手性双芳基醇合成中的应用, 作者对其进行分离纯化, 研究了 *KpADH* 的酶学性质及不对称还原反应效果。

2.2 *KpADH* 的蛋白质序列分析

羰基还原酶的分类有很多, 按催化功能及空间结构的差异可以分为 3 大类: 醛还原酶 (AKR)、短链脱氢酶 (SDR) 及中链醇脱氢酶^[15]。SDR 是氧化还原酶中具有多样性功能的一类酶, 其蛋白质结构中一般包含保守 N 端、参与 NAD(P)(H) 识别和结合的 Rossmann 折叠、底物结合结构域和非保守的 C 端。Extended SDR 和 Classical SDR 是 SDRs 家族中最重要的两个亚家族, Extended SDRs 家族的酶有共同的辅因子结合区域及结合序列, 即位于 N 端的 [S/T]GXXGXX [G/A](X 代表任意的一种氨基酸) 序列, 除此之外还有保守的催化基序 YXXXX。将 *KpADH* 的氨基酸序列在 NCBI 数据库中比对显示, *KpADH* 属于 Extended SDR 亚家族。从数据库中选出了 *KpADH* 的同源酶, 并进行多序列比对, 结果见图 1。可以看出, *KpADH* 虽然与这些酶在一级序列上具有一定的差异性, 但二级结构很保守, 且具有

保守的辅因子识别区和催化三联体, 如 Ser126, Tyr165 和 Lys169(红色三角形标识)。综上, *KpADH* 与已知醇脱氢酶 *CpSADH* 的序列一致性仅为 38%,

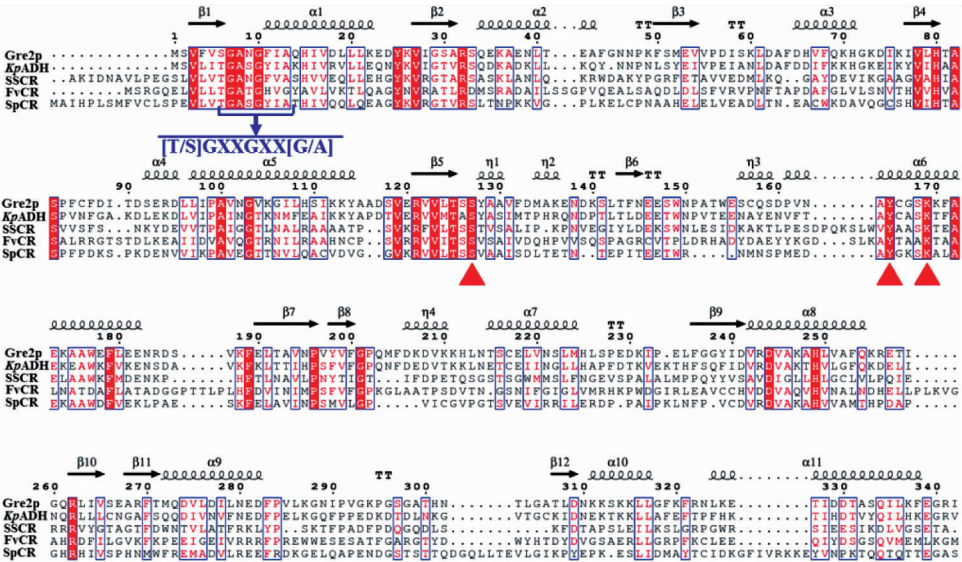
且未曾有关于该酶催化功能的研究报道, 该酶属于短链脱氢酶家族的新成员。

表 3 基因数据挖掘中所选取的假定羰基还原酶

Table 3 Putative carbonyl reductases selected from NCBI database using genome mining

酶	Genbank 登陆号	来源菌株	碱基数/bp	相对分子质量	与探针蛋白序列一致性	活性/(Umg)		ee/%
						氧化活力	还原活力	
CR1	EDO16647.1.	<i>Kluyveromyces polysporus</i>	1026	38 800	38%	0.40	1.41	82.3
CR2	EDK41944.1.	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1113	39 600	71%	<0.01	<0.01	n.d. a
CR3	ABN66727.2.	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	1008	36 200	65%	<0.01	<0.01	n.d.
CR4	BAB67688.1.	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	1041	37 600	35%	<0.01	<0.01	n.d.
CR5	EFE82397.2.	<i>Streptomyces albus J1074</i>	1038	36 100	35%	<0.01	<0.01	n.d.
CR6	AAZ55525.1.	<i>Thermobifida fusca</i>	1080	37 100	36%	<0.01	<0.01	n.d.
CR7	EDK43725.1.	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1008	37 300	34%	<0.01	<0.01	n.d.
CR8	AB047396.1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	930	34 100	45%	<0.01	<0.01	n.d.
CR9	EDK47211.1.	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	885	33 000	40%	<0.01	<0.01	n.d.

注: a 没有检测到。



注: Gre2p (*Saccharomyces cerevisiae*, gi:57013849); SSCR (*Sporobolomyces salmonicolor*, gi:56554169); FvCR (*Fusarium verticillioides*, gi:25294137); SpCR (*Strongylocentrotus purpuratus*, gi:115923406)。

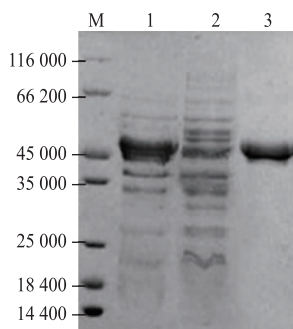
图 1 *KpADH* 与来源于 Extended SDRs 家族蛋白质的氨基酸序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of *KpADH* to other carbonyl reductase sequences

2.3 *KpADH* 的纯化

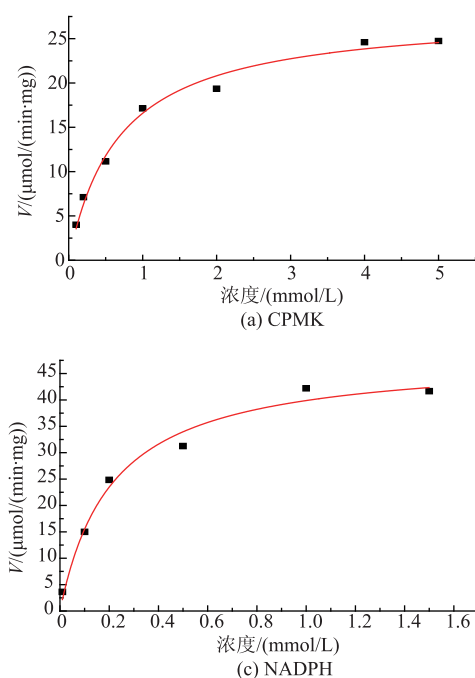
为了研究 *KpADH* 的酶学性质, 对重组 *KpADH* 依次进行镍柱纯化、脱盐和浓缩处理, 最终得到 0.5 mg/mL 的纯酶。对粗酶、穿透峰蛋白和纯酶进行 SDS-PAGE 分析, 见图 2。 *KpADH* 纯酶仅有一条带, 纯酶纯度达到电泳纯, 活力回收率约为 45.5%。根据 SDS-PAGE 图计算可知, *KpADH* 单亚基的相对分子

质量约为 45 000, 与理论相对分子质量大小相符。纯酶的比还原活力 8.9 U/mg, 粗酶的比还原活力为 1.4 U/mg, 纯化倍数为 6 倍。辅因子依赖性测定显示, *KpADH* 既可以依赖于 NADPH 也可依赖于 NADH, 且在 NADPH 存在下 *KpADH* 的活力约为 NADH 的 5 倍。



M: 蛋白质 marker; 1: 粗酶液; 2: 镍柱纯化的穿透峰蛋白质; 3: *KpADH* 纯酶。

图 2 纯化 *KpADH* 的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified *KpADH*



2.4 *KpADH* 的动力学参数的测定

K_m 是酶的一个特征性常数, K_m 的大小只与酶的性质有关, K_m 越小亲和力越大, k_{cat} 越大催化效率越高, 为了研究该酶对底物的亲和力和催化效率, 作者测定 *KpADH* 在不同底物浓度和辅酶浓度情况下的酶活, 并得到了很好的线性拟合, 见图 3。计算得到 *KpADH* 的动力学参数, 见表 4。

由表 4 可知, 该酶对 CPMK 的亲和力 ($K_m=0.50$ mmol/L) 高于对异丙醇的亲和力 ($K_m=6.36$ mmol/L), 且还原 CPMK 的速率 ($k_{cat}=64.67$ s⁻¹) 高于氧化异丙醇的速率 ($k_{cat}=55.27$ s⁻¹), 因此 *KpADH* 对 CPMK 的底物专一性常数 k_{cat}/K_m (129.33 L/(s·mmol)) 高于异

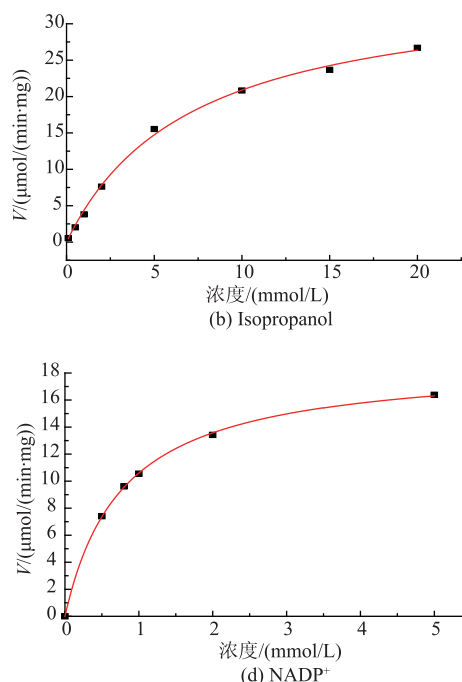


图 3 *KpADH* 的动力学参数

Fig. 3 Kinetic parameters of *KpADH*

表 4 *KpADH* 的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of purified *KpADH*

物质	K_m /(mmol/L)	V_{max} /(μ mol/(min·mg))	k_{cat} /s ⁻¹	k_{cat}/K_m (L/(s·mmol))
CPMK	0.500	25.0	64.7	129
NADPH	0.200	45.7	118	601
Isopropanol	6.36	21.4	55.3	8.69
NADP ⁺	0.760	18.7	48.4	63.4

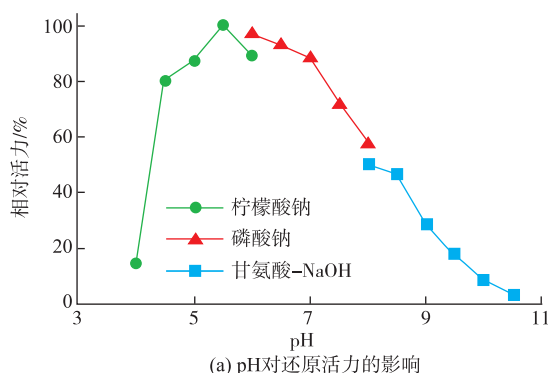
丙醇 (8.69 L/(s·mmol))。由此可知该酶更倾向于发挥还原 CPMK 的功能, 有利于还原反应朝 (R)-CPMA 合成的方向进行。该酶对辅酶 NADPH 的

k_{cat} , k_{cat}/K_m 均高于 NADP⁺, 说明该酶更倾向于氧化 NADPH, 这也符合该酶倾向于还原 CPMK 的结果。

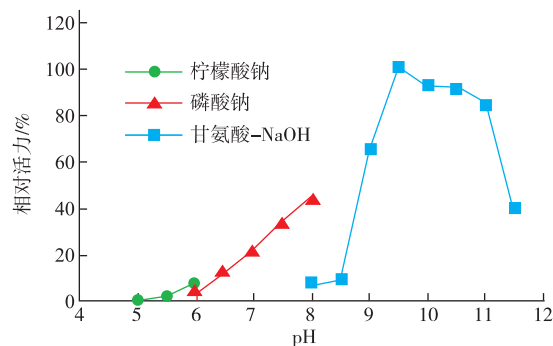
2.5 pH 对 *KpADH* 催化活性的影响

缓冲液的 pH 会通过改变活性中心的微环境来影响酶的催化活性, 本研究测定在不同的 pH 缓冲液中 (柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.0~6.0)、磷酸钠缓冲液 (pH 6.0~8.0)、甘氨酸-NaOH 缓冲液 (pH 8.0~12.0)) *KpADH* 的氧化和还原活力的高低, 结果见图 4。对于 *KpADH* 的还原活力, 其最适 pH 5.5, 当 pH<5.5 时活力迅速下降, 当 pH>5.5 时下降缓慢, 且在碱性范围内 *KpADH* 仍保留有一定的催化活力, 如

在 pH 8.0 时,相对活力约为 58%。对于 *KpADH* 的氧化活力,其最适 pH 为 9.5,当 pH<9.5 时,活力迅速下降,在酸性范围内仅保留有约 40% 的催化活力,在 pH 9.5~11.0 时, *KpADH* 的相对氧化活力>80%。此外,在氧化反应的最适 pH 下,还原活力仅 27%,而在还原反应的最适 pH 下,氧化活力仅 5%。为了利用该酶的底物偶联辅因子再生的优势,需要同时具备较高的氧化和还原活力,才能实现辅因子原位再生和底物还原的目标。因此在生物催化过程中,需要对反应缓冲液的 pH 值进行优化,选择氧化和还原活力均较高的 pH,以使得催化剂发挥最大的作用。



(a) pH对还原活力的影响



(b) pH对氧化活力的影响

图 4 pH 对 *KpADH* 酶活力的影响Fig. 4 Effect of pH on the activity of purified *KpADH*

2.6 金属离子及添加剂对 *KpADH* 活力的影响

据报道,少数 SDR 家族的羰基还原酶具有金属离子依赖性,如二价金属离子 Mg^{2+} 可通过作用于酶的活性中心或底物结合位点而影响酶的活力。作者考察了不同金属离子对羰基还原酶 *KpADH* 活力的影响,以不添加金属离子所测得的酶活力为对照 (100%), 结果见表 5。没有发现具有显著激活 *KpADH* 的氧化和还原活力的金属离子。 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Li^{+} 等离子对 *KpADH* 的还原和氧化活力的有轻微的激活作用,相对还原和氧化活力分别约

表 5 金属离子及添加剂对 *KpADH* 的还原酶和氧化酶活力的影响Table 5 Effects of metal ions and additives on the reducing and oxidizing activities of *KpADH*

金属离子	相对活力/%		添加剂	相对活力/%	
	还原活力	氧化活力		还原活力	氧化活力
Control	100	100	TritonX100	126±0.3	138±1.6
Mg^{2+}	108±1.3	118±2.7	SDS	7.90±2.5	8.20±0.9
Zn^{2+}	67.3±1.2	15.0±0.4	吐温 20	130±1.5	140±2.2
Al^{3+}	61.4±2.1	37.2±1.6	DTT	118±0.5	105±3.7
Ni^{2+}	110±0.6	102±7.3	β -巯基乙醇	115±2.8	107±2.0
Ba^{2+}	108±2.4	125±2.5	EDTA	107±1.3	116±1.9
Co^{2+}	108±2.1	112±6.5			
Cu^{2+}	15.0±1.6	1.00±0.4			
Li^{+}	114±2.9	117±3.4			
Ag^{+}	3.40±2.9	1.00±0.4			
Ca^{2+}	110±3.1	128±4.9			
Fe^{3+}	11.1±2.8	8.40±0.4			
Mn^{2+}	114±1.9	112±6.3			

为 110% 和 120%; Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Fe^{2+} 等离子对 *KpADH* 的氧化和还原活力都具有严重的抑制作用,推测可能是因为 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Fe^{2+} 与参与催化的氨基酸残基结合从而导致了酶的活力下降。

EDTA 的添加并没有使酶活力降低,从另一方面说明 *KpADH* 不是金属离子依赖性酶。蛋白质变性剂 SDS 的添加导致酶解聚成单体,而单体仅保留有 8% 的相对活力,说明 *KpADH* 的活性依赖于多聚

体。吐温 20、DTT、 β -巯基乙醇的添加可在一定程度上促进 *KpADH* 的氧化和还原活力。其中,吐温 20 使酶活力增加最多,可能由于吐温 20 作为分散剂增加了难溶底物 CPMK 在水中的溶解度,从而增大了酶与底物的接触机率;另外 DTT 与 β -巯基乙醇是还原剂,二者的添加可以防止二硫键之间的交联,这可能是二者添加使得酶活力增大的原因。

2.7 有机溶剂对 *KpADH* 活力的影响

生物催化反应的底物大部分都是不溶于水或难溶于水的,在催化反应中需要添加助溶剂,以增加酶与底物接触的机会,降低传质阻力。生物催化反应要求助溶剂具有较好的生物相容性、对酶的毒性小、对底物的溶解性高。因此考察了常用有机溶剂如甲醇、乙醇、异丙醇、四氢呋喃、丙酮对酶活力的影响,CPMK 在这 5 种有机溶剂中的溶解度能达到 500 mmol/L,而且甲醇、乙醇和异丙醇也可作为催化反应的辅底物。由图 5(a)可知,对于 *KpADH* 的还原活力,在体积分数 0.5% 的 5 种溶剂中,酶活力都明显高于空白对照,而在体积分数 1% 时,酶活力开始降低,当体积分数大于 3% 时,酶活力快速降低。由此可见,低体积分数的有机溶剂可以使 CPMK 更好的分散,从而可以促进酶活力,而随着有机溶剂体积分数逐渐增加到一定程度,其毒性逐渐增强,酶活力显著降低。另外,在低体积分数有机溶剂条件下,甲醇是很好的助溶剂,而在稍高的体积分数(如 3%)时乙醇则是最好的助溶剂。异丙醇可作为 *KpADH* 的辅底物,适量的异丙醇即可促进底物溶解,提高 *KpADH* 的催化活力,异丙醇达 20% 时,*KpADH* 仍保留 30% 的相对活力,可见 *KpADH* 具有良好的异丙醇耐受性。由图 5(a)可知,表观上丙酮对 *KpADH* 没有毒性,20% 的丙酮存在下 *KpADH* 仍保留 117% 的相对活力,这是由于丙酮自身也可作为 *KpADH* 的底物而被还原,因此丙酮对 *KpADH* 的影响要从氧化活力的变化来判断。

由图 5(b)可知,随着乙醇、甲醇、四氢呋喃、丙酮的体积分数增高,酶氧化活力急剧降低,由此可见有机溶剂对 *KpADH* 氧化功能的毒性大于还原功能,尤其是四氢呋喃,仅 0.5% 即可抑制 90% 的氧化活力。丙酮作为异丙醇氧化的产物,对 *KpADH* 活力的影响同样非常显著,当丙酮体积分数大于 5% 时,氧化活力降低至 20%。综上,异丙醇可以作为该生物还原反应优选的助溶剂和辅底物,然而其辅产物

丙酮对酶活力存在一定的影响,移除高体积分数的丙酮可以降低抑制作用,促进生物还原反应朝手性双芳基醇合成的方向进行。

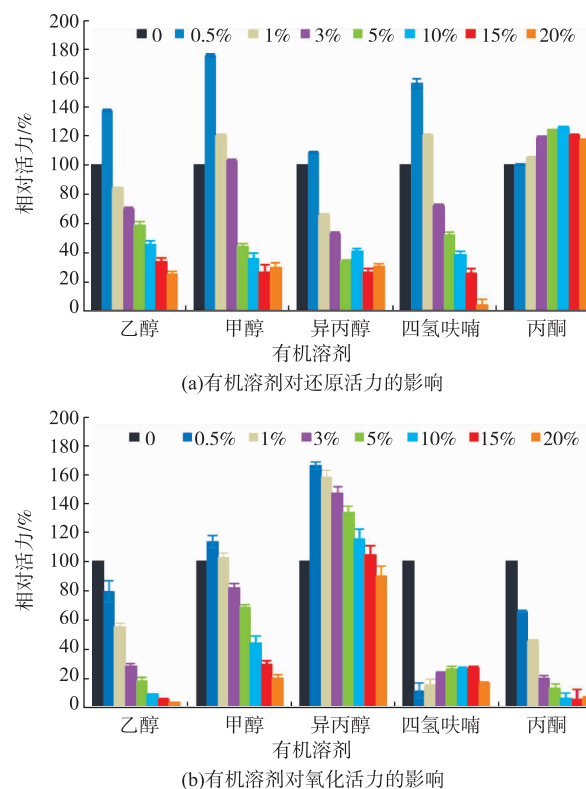


图 5 有机溶剂对 *KpADH* 的还原和氧化活力的影响
Fig. 5 Effect of organic solvents on the reducing and oxidizing activities of *KpADH*

2.8 *KpADH* 的底物特异性

为了研究 *KpADH* 不对称还原多种潜手性酮的能力,拓展 *KpADH* 的应用范围,对其底物特异性进行考查。选取一系列不同酮类(芳基酮、双芳基酮、酮酯和烷基二酮)和醇类底物,考察 *KpADH* 对这些底物的氧化和还原活力,结果见表 6。对于芳基酮类底物,*KpADH* 对 CPMK 和苯乙酮均表现出较高的还原活力(100%和 56.4%),这类底物位阻大,在水中溶解度低,与羰基还原酶的天然底物性质相差较大,对此类底物有高的催化活性的酶较少。对比二苯甲酮,苄基苯乙酮和 3,4-二氯二苯甲酮发现,随着空间位阻的进一步增大,*KpADH* 的催化活性逐渐降低。对于 2,3-戊二酮、2,4-戊二酮、2,3-己二酮、3,4-己二酮和 2,5-己二酮等二酮类底物,*KpADH* 更易于还原 2,4-戊二酮(74.6% 相对活力)。*KpADH* 对酮酯类底物的活力较高,对 2-氧-4-苯基

丁酸乙酯和乙酰乙酸乙酯的还原活力可以达到 CPMK 的 24 倍左右。对于氧化反应的底物特异性,除了 2,3-丁二醇外,相对活力均小于 10%。*KpADH* 氧化 2,3-丁二醇的活力是氧化异丙醇活力的 3.6 倍,表明 2,3-丁二醇可作为用于辅因子再生的潜在辅底物。

表 6 *KpADH* 的底物特异性

Table 6 Substrate specificity of *KpADH* towards various prochiral ketones

底物	相对还原活力/%	底物	相对氧化活力/%
CPMK	100±0.2	异丙醇	100±0.4
苯乙酮	56.4±3.1	2,3-丁二醇	364±0.4
3,4-二氯二苯甲酮	3.90±0.6	甘露醇	0.700±0.1
苄基苯乙酮	2.50±0.2	异丁醇	3.80±0.1
二苯甲酮	16.6±0.1	甲醇	0.800±0.1
2,3-戊二酮	6.40±0.2	1,4-丁二醇	0.900±0.1
2,4-戊二酮	74.6±4.0	正丁醇	1.20±0.2
2,3-己二酮	10.2±0.2	1,2-丙二醇	2.60±0.1
2,5-己二酮	4.00±0.1	正丙醇	3.60±0.1
3,4-己二酮	21.5±1.0	乙醇	0.540±0.1
2-氧-4-苯基丁酸乙酯	2324±0.2	丙三醇	<0.01
乙酰乙酸乙酯	2581±0.2		

2.9 利用 *KpADH* 不对称还原制备 (*R*)-CPMA

由于 *KpADH* 的氧化和还原活力的最适 pH 有所差异,合适的反应缓冲液对于 *KpADH* 催化的生物还原反应非常重要。因此考察利用 *KpADH* 在不同 pH (pH 7.0, 8.0 和 9.0) 条件下催化反应的效果。反应相同时间后,终止反应,液相色谱分析发现 *KpADH* 在 pH 8.0 的缓冲液中转化率最高(>99%),此时 *KpADH* 的相对还原活力和氧化活力分别为初始活力的 43% 和 72%。所以选择 pH 8.0 的缓冲液研究重组菌全细胞催化还原 CPMK。

进一步研究 *KpADH* 在制备双芳基甲醇中的效果。在 10 mL 反应体系中,利用重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*kpadh* 全细胞对 100 mmol/L 的 CPMK 进行不对称还原,反应进程见图 6。在 10 h 内,CPMK 转化率达到 99.8%,经分离纯化后产物 (*R*)-CPMA 的摩尔得率为 88.7%,*ee* 值为 82%。据报道^[16],利用来源于 *Kluyveromyces marxianus* 的羧基还原酶 *K_mCR*

催化还原 50 mmol/L CPMK,反应 12 h 后,转化率不到 20%,产物 (*R*)-CPMA 的 *ee* 值仅为 23.4%;利用来源于毕赤酵母 GS115 的羧基还原酶 PasCR 催化还原一系列二芳香基甲酮类化合物 (10 mmol/L),转化率最高仅为 90%,且 *ee* 值较低^[17]。尽管双芳基甲酮类底物的位阻较大,*KpADH* 仍然表现出较高的催化活性,为手性催化合成 (*R*)-CPMA 奠定了重要基础。

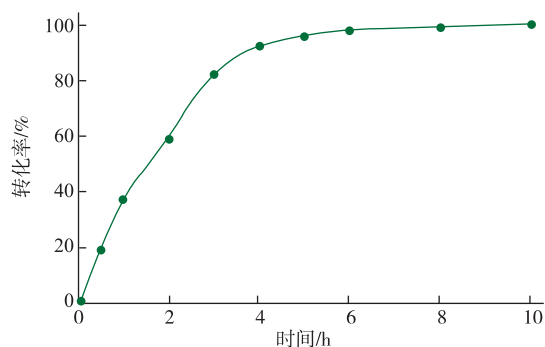


图 6 重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*kpadh* 水相中不对称催化还原 CPMK 的反应进程曲线

Fig. 6 Time course of asymmetric reduction of CPMK by *E. coli* BL21/pET28a-*kpadh* in aqueous system

3 结语

采用基因组数据挖掘的策略,从 *Kluyveromyces polysporus* 中发现了具有还原双芳基酮活力的醇脱氢酶 *KpADH* 基因,并成功地在 大肠杆菌 中实现可溶性表达。*KpADH* 属于短链脱氢酶家族,具有保守的催化三联体和辅酶结合域。*KpADH* 可利用异丙醇为辅底物,原位再生辅酶 NADPH。底物特异性研究发现,*KpADH* 对酮酯类底物和 2,3-丁二醇有更高的活力,分别是对 CPMK 和异丙醇活力的 24 倍和 3.6 倍左右。动力学参数研究表明,该酶更适合发挥其还原功能。*KpADH* 氧化活力的最适 pH 9.5,还原活力的最适 pH 5.5,全细胞催化反应的最适 pH 8.0。在水相中能够不对称催化还原 100 mmol/L CPMK,转化率达到 99.8%,摩尔得率为 88.7%,产物 (*R*)-CPMA 的 *ee* 值达到 82%,是迄今为止不对称还原双芳基酮类底物效果较出色的一种新酶。本研究对高效制备光学纯 CPMA 具有一定的指导意义,为进一步利用其合成光学纯手性双芳基醇,我们正在开展 *KpADH* 立体选择性的分子改造。

参考文献:

- [1] SCHMIDT F,STEMMLER R T,RUDOLPH J,et al. Catalytic asymmetric approaches towards enantiomerically enriched diaryl methanols and diaryl methylamines[J]. **Chemical Society Reviews**,2006,35:454-470.
- [2] SUI Y Z,ZHANG X C,WU J W,et al. CuII-catalyzed asymmetric hydrosilylation of diaryl- and aryl heteroaryl ketones: application in the enantioselective synthesis of orphenadrine and neobenodine[J]. **Chemistry:A European Journal**,2012,18:7486-7492.
- [3] REAMER R A,CHILENSKI J R,McWilliams C J. Highly enantioselective hydrogenation of aromatic-heteroaromatic ketones[J]. **Organic Letters**,2003,5:5039-5042.
- [4] COREY E J,HELAL C J. Asymmetric synthesis of (*S*)-carbinoxamine. New aspects of oxazaborolidine-catalyzed enantioselective carbonyl reduction[J]. **Tetrahedron Letters**,1996,37:5675-5678.
- [5] TRUPPO M D,POLLARD D,DEVINE P. Enzyme-catalyzed enantioselective diaryl ketone reductions[J]. **Organic Letters**,2007,9:335-338.
- [6] ZHU D M,YANG Y,MAJKOWICZ S. Inverting the enantioselectivity of a carbonyl reductase via substrate-enzyme docking-guided point mutation[J]. **Organic Letters**,2008,10:525-528.
- [7] LI H M,ZHU D M. Enantioselective reduction of diaryl ketones catalyzed by a carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor* and its mutant enzymes[J]. **Advanced Synthesis & Catalysis**,2009,351:583-588.
- [8] NI Y,ZHOU J Y,SUN Z H. Production of a key chiral intermediate of Betahistine with a newly isolated *Kluyveromyces* sp. in an aqueous two-phase system[J]. **Process Biochemistry**,2012,47:1042-1048.
- [9] 周婕妤. 克鲁维酵母不对称还原合成倍他司汀重要手性中间体的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [10] INOUE H,NOJIMA H,OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. **Gene**,1990,96:23-28.
- [11] 许国超. 芳基酮还原酶的发现、改造及其催化制备手性仲醇的研究[D]. 上海:华东理工大学,2013.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72:248-254.
- [13] YAMAMOTO H,MATSUYAMA A,KOBAYASHI Y. Synthesis of (*R*)-1,3-butanediol by enantioselective oxidation using whole recombinant *Escherichia coli* cells expressing(*S*)-specific secondary alcohol dehydrogenase[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,2002,66:925-927.
- [14] YAMAMOTO H,MATSUYAMA A. Purification and characterization of (*S*)-1,3-butanediol dehydrogenase from *Candida parapsilosis*[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**,1995,59:1769-1770.
- [15] TIAN Laiqiang,LIU Weidong. Biochemical characterization and substrate profile of a highly enantioselective carbonyl reductase from *Pichia pastoris*[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2013,29:169-179.(in Chinese)
- [16] LI H D,SUN Z H,NI Y. Novel stereoselective carbonyl reductase from *Kluyveromyces marxianus* for chiral alcohols synthesis[J]. **Chemical Research in Chinese Universities**,2013,29:1140-1148.
- [17] LI Zhe,LIU Weidong,ZHU Dunming. Cloning and characterization of a novel carbonyl reductase for asymmetric reduction of bulky diaryl ketones[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2013,29:68-77.(in Chinese)