

R-苯基乙二醇的羰基还原酶与甲酸脱氢酶偶联催化制备

张荣珍, 徐岩, 耿亚维, 王珊珊, 孙莹

(江南大学生物工程学院教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:以重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* 全细胞为催化剂, 2-羟基苯乙酮和甲酸钠为双底物, 研究了生物催化反应体系中温度、pH 值、底物 2-羟基苯乙酮的初始浓度、反应时间、细胞浓度和状态等对产物(R)-苯基乙二醇生成效率的影响规律。结果表明, 在温度 35℃ 和 pH 7.0、底物初始浓度 6 g/L、时间 36 h、湿细胞浓度 10%(w)的条件下, 产物的光学纯度高达 98.37% e.e., 得率达 79.14%。在上述反应体系中添加 5 mmol/L ZnSO₄ 后, 重组菌催化的不对称还原反应效率显著提高, 产物(R)-苯基乙二醇光学纯度达到 100% e.e., 得率高达 86.3%。

关键词:重组大肠杆菌; 生物催化; (R)-苯基乙二醇; 光学纯度; 得率

中图分类号: Q814.4

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2009)04-0801-05

1 前言

甲酸脱氢酶(FDH)能使甲酸氧化生成 CO₂, 同时使氧化态辅酶 NAD⁺ 还原为 NADH, 它可与多种酶偶联, 是一种非常优良而广泛使用的 NADH 循环“再生剂”。Groger 等^[1]将来源于 *Candida boidinii* 的甲酸脱氢酶与 *Rhodococcus erythropolis* 的 S 型乙醇脱氢酶偶联, 大大提高了产物的光学纯度。Degussa 公司将甲酸脱氢酶与亮氨酸脱氢酶(LeuDH)偶联合成 L-叔亮氨酸, 大大提高了产物的转化率^[2]。Weekbecker 等^[3]将嘧啶核苷转氨酶、醇脱氢酶和甲酸脱氢酶共表达生产(R)-苯乙醇。

(R)-苯基乙二醇是一种非常重要的手性化学剂和手性材料, 是液晶中不可缺少的手性添加剂, 也是合成许多光学活性药物和农药的重要手性中间体^[4,5]。手性醇常采用生物酶法催化制备, 需要加入昂贵的辅酶 [NADP(H)或 NAD(H)]。本实验室已成功构建了近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* CCTCC M203011)的(R)-羰基还原酶和博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的甲酸脱氢酶偶联的重组菌株 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh*, 前期研究结果^[6]表明, 该酶偶联体系具有合成(R)-苯基乙二醇的生物功能。由于该反应体系涉及 2 种酶参与反应, 其催化特性和底物各异, 所依赖的反应条件和底物浓度也不同, 因而有必要对该体系的反应条件重新选择。本工作研究了催化反应的主要影响因子(反应温度、pH 值、底物 2-羟基苯乙酮的初始浓度、时间和活细胞状态等)对产物合成效率的影响规律, 确定了最佳的生物反应条件, 最终获得了高光学纯度(100% e.e.)和高得率

(86.3%)的(R)-苯基乙二醇。

2 实验

2.1 材料

2.1.1 菌株与质粒

重组质粒 pETDuet-*rcr-fdh* 和 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* 重组菌由本实验室构建^[7]。

2.1.2 主要试剂和仪器

底物 2-羟基苯乙酮由本实验室按 Liese 等^[8]的方法合成, 其余试剂均为国产分析纯。HP1100 高效液相色谱仪(紫外检测器, 美国 Agilent 公司), Chiralcel OB-H 色谱柱(日本 Daicel 公司)。

2.1.3 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0。固体培养基加入 15% 琼脂糖, 使用前加氨苄青霉素和氯霉素分别至终浓度为 50 和 34 mg/L。

2.2 重组菌的培养

将重组质粒 pETDuet-*rcr-fdh* 转化感受态细胞 *E. coli* Rosetta (DE3)菌株, 涂布双抗平板(氨苄青霉素 50 mg/L、氯霉素 34 mg/L), 从平板上挑取单菌落接种于同样抗性的 LB 液体培养基中, 当菌体的 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时加入 1 mmol/L IPTG, 30℃ 诱导表达 8 h 后收集菌体。

2.3 反应温度对转化反应的影响

在 1 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中加入 5 g/L 底物 2-羟基苯乙酮, 甲酸钠 5 g/L, 细胞湿重 0.2 g, 反应体系 pH 6.5, 反应温度 20~45℃, 反应 48 h, 通过手性固定相高效液相色谱(HPLC)对产物进行分析^[3], 选择产物

收稿日期: 2008-12-04, 修回日期: 2009-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20776060); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB716008); 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2007AA02Z200, 2006AA020104); 新世纪优秀人才支持计划资助项目(编号: NCET-04-0498)

作者简介: 张荣珍(1973-), 女, 江西省奉新县人, 博士研究生, 主要从事分子生物学和生物催化研究, E-mail: rzzhang666@yahoo.com.cn; 徐岩, 通讯联系人, Tel: 0510-85918201, E-mail: biosean@yahoo.com.cn.

光学纯度最高时的反应温度. 得率为(*R*)-苯基乙二醇与初始羟基苯乙酮的比值.

2.4 缓冲液 pH 值对转化反应的影响

确定合成反应温度后, 选择反应 pH 为 5~8, 其余反应条件同上, 确定产物光学纯度最高时的反应 pH 值.

2.5 底物 2-羟基苯乙酮初始浓度对转化反应的影响

确定反应温度和 pH 后, 在底物浓度 1~7 g/L 的条件下, 选择产物光学纯度最高时的底物初始浓度.

2.6 细胞浓度对转化反应的影响

确定温度、pH、底物初始浓度后, 在细胞湿重 0.5%~4% 条件下, 选择产物光学纯度最高时的细胞浓度.

2.7 反应时间对转化反应的影响

确定反应温度、pH、底物初始浓度和细胞浓度后, 选择反应时间 12~60 h, 每隔 12 h 取样分析, 选择产物光学纯度最高时的反应时间.

2.8 Zn²⁺浓度对转化反应的影响

确定反应温度、pH、底物初始浓度、细胞浓度和反应时间后, 添加 1~6 mmol/L ZnSO₄ 进行生物转化反应, 选择产物光学纯度最高时的 ZnSO₄ 浓度.

3 结果与讨论

3.1 反应温度对转化反应的影响

反应温度对生物合成反应有较大影响. 一定温度范围内, 随温度升高酶活力增加, 反应底物活化速率加快, 因而产物生成速率加快^[9]. 温度过高导致菌体生长不良和酶蛋白变性失活, 生物反应效率下降. 在重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*r-cr-fdh* 转化体系中, 当反应温度为 35℃ 时, 产物合成效果最好, 产物的光学纯度接近 90% e.e., 得率接近 70%, 见图 1.

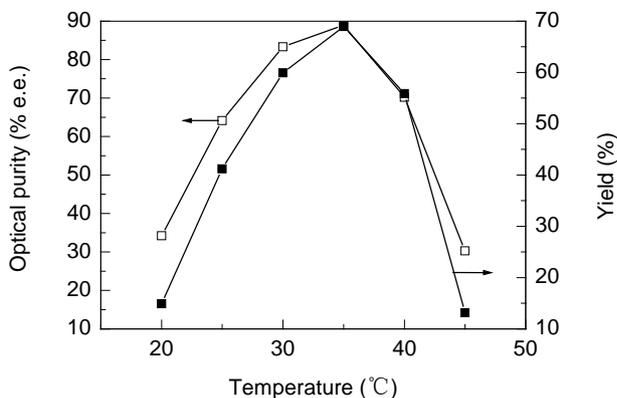


图1 反应温度对转化反应的影响
Fig.1 Effect of temperature on biotransformation reaction

3.2 pH 值对转化反应的影响

反应体系的 pH 值影响酶蛋白的构型及稳定性、或

酶的活性中心必需基团和底物的解离状态, 从而影响酶的立体选择性和催化活性. 前期研究结果表明, 近平滑假丝酵母(*C. parapsilosis*)的(*R*)-羧基还原酶催化反应的最适 pH 为 6.0~8.5^[7], 博伊丁假丝酵母(*C. boidinii*)的甲酸脱氢酶的最适 pH 为 6.5~8.5^[10,11]. 由于(*R*)-羧基还原酶和甲酸脱氢酶的双酶偶联体系中同时涉及 2 种酶和 2 种底物, 因而有必要对其最适 pH 值重新进行选择. 由图 2 可知, 反应温度为 35℃ 时, 反应体系的 pH 值为 5.0~7.0, 产物的光学纯度和得率随 pH 值增加而显著增大, pH 值为 7.0~8.0 时则随 pH 值增加而明显减小, 当 pH 值为 7.0, 产物的光学纯度和得率达最大值, 分别为 96.12% e.e. 和 76.36%.

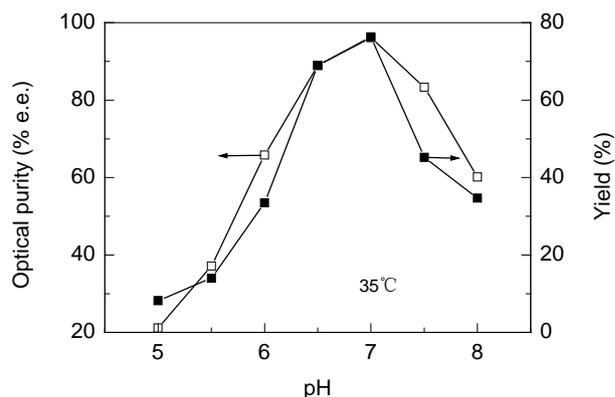


图2 缓冲液 pH 值对转化反应的影响
Fig.2 Effect of buffer pH on biotransformation reaction

3.3 底物 2-羟基苯乙酮初始浓度对转化反应的影响

重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*r-cr-fdh* 转化体系中, 底物 2-羟基苯乙酮初始浓度为 1~6 g/L 时, 产物(*R*)-苯基乙二醇的光学纯度和得率变化不大(图 3). 说明较高底物初始浓度对酶偶联体系的不对称还原反应并没有产生明显的抑制作用. 与前期的研究^[7]相比, 菌体对底物浓度的耐受性由原来的 0.5 g/L 提高到了 6 g/L. 氧化还原反应中, 辅酶不能再生循环是限制反应的瓶颈^[12-14]. 重组菌 *E. coli* Rosetta/pETDuet-*r-cr-fdh* 由于含有参与辅酶再生循环的甲酸脱氢酶, 反应体系有较强的辅酶再生能力, 因而能催化高浓度(6 mg/L)底物的不对称还原反应, 产物的光学纯度和得率随底物初始浓度增加而基本保持不变. 当底物浓度升高至 7 g/L 时, 产物的光学纯度和得率开始降低. 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.

3.4 细胞浓度对转化反应的影响

由图 4 可知, 当底物初始浓度为 6 g/L、细胞湿重为 5%~10% 时, 产物的光学纯度和得率随细胞浓度的增加而增大; 当细胞湿重增加到 10%~40% 时, 产物的光

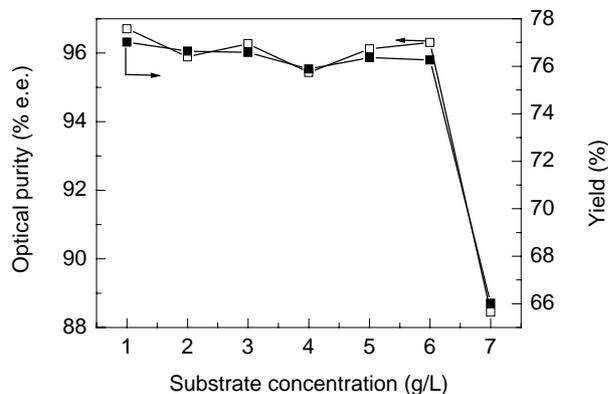


图3 底物2-羟基苯乙酮初始浓度对转化反应的影响
Fig.3 Effect of initial substrate concentration on biotransformation reaction

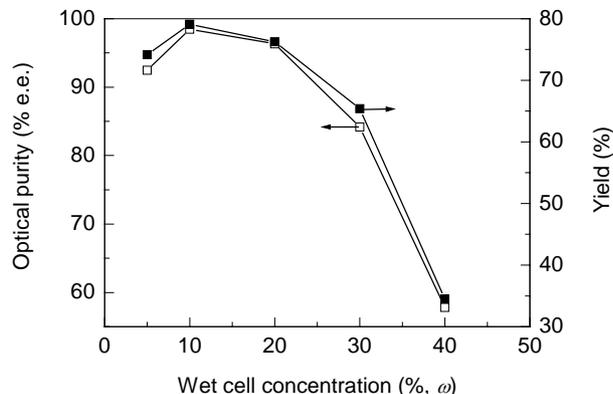


图4 细胞浓度对转化反应的影响
Fig.4 Effect of wet cell concentration on biotransformation reaction

学纯度和得率随细胞浓度增加而减小。当细胞湿重为10%时,产物的光学纯度和得率达最高,分别为98.45% e.e.和79.09%。在一定范围内,细胞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。但当细胞浓度过高时,会使反应过程中的传质与供氧受到严重影响,直接导致反应效率降低。

3.5 反应时间对转化反应的影响

由图5可知,在酶偶联催化反应体系中,当反应时间为12~36 h,产物的光学纯度和得率随反应时间的延长而增加;当反应时间超过36 h后,产物的光学纯度和得率随反应时间延长而降低;特别是反应进行到48 h后,反应产物的光学纯度和得率急剧下降。可见反应时间过长,细胞开始衰败,菌体发生自溶现象而导致细胞内酶活力急剧下降或丧失,产物也因长时间未分离而造成光学纯度和得率降低。与含(R)-羰基还原酶的重组大肠杆菌相比,(R)-羰基还原酶和甲酸脱氢酶的偶联体系的生物转化反应时间由48 h^[7]缩短到36 h,产物光学纯度基本保持不变。

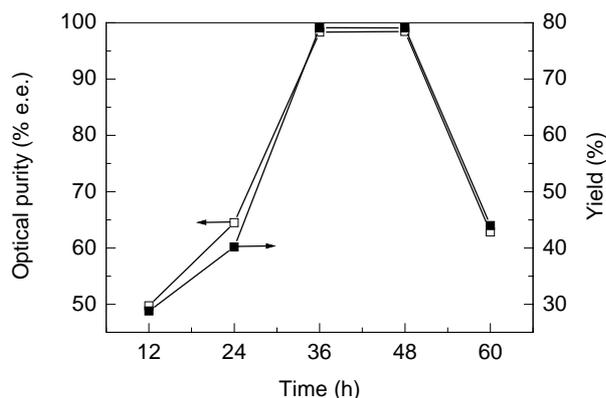


图5 反应时间对转化反应的影响
Fig.5 Effect of reaction time on biotransformation reaction

3.6 细胞状态对转化反应的影响

从泛解酮酸内酯到泛解酸内酯的还原反应过程中,重组菌的湿细胞完全没有产物合成能力,只有冻干细胞才表现出合成活性^[14],可见在转化反应过程中细胞状态也是影响反应的重要因素之一。为考察双酶偶联后的重组菌处于不同细胞状态时生物转化反应能力的差异,分别以湿细胞与冻干细胞为催化剂进行产物光学纯度研究。结果表明(图6),在双酶偶联反应体系中,湿细胞与冻干细胞的不对称还原反应产物的光学纯度和得率没有太大差异,但从经济角度,应该选择重组菌湿细胞。

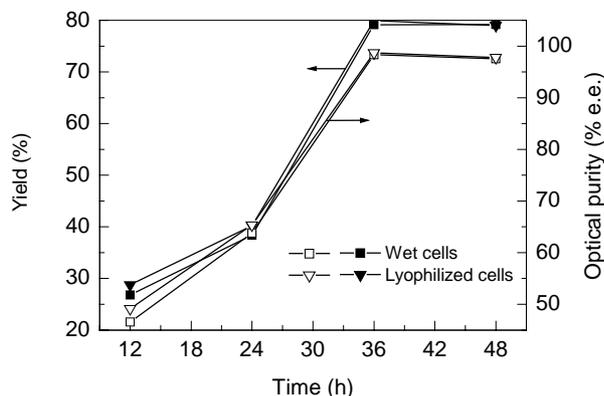


图6 细胞状态对转化反应的影响
Fig.6 Effect of cell forms on biotransformation reaction

3.7 Zn²⁺对转化反应的影响

(R)-羰基还原酶和甲酸脱氢酶均属中链脱氢酶,它们的1个酶分子中都包含有2个Zn²⁺,其中1个Zn²⁺结合于酶的催化中心^[15,16]。为进一步提高重组菌*E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh*d的生物反应效率,考察了ZnSO₄浓度对产物合成的影响。如图7所示,当Zn²⁺浓度为1~5 mmol/L时,产物(R)-苯基乙二醇的得率随Zn²⁺浓度增加而增大,产物光学纯度均保持在100% e.e.左右。

当 Zn^{2+} 浓度大于 5 mmol/L 时, 产物得率随 Zn^{2+} 浓度增加而保持不变. 当 Zn^{2+} 浓度为 5 mmol/L, 产物的光学纯度和得率分别为 100% e.e. 和 86.3%. Zn^{2+} 对转化反应的促进作用很可能是由于 (R)-羧基还原酶和甲酸脱氢酶同属中链脱氢酶, Zn^{2+} 是催化中心必需的^[17,18], 因而添加一定浓度的“功能性元素” Zn^{2+} 会大大加强 (R)-羧基还原酶(RCR)和甲酸脱氢酶(FDH)的催化功能, 提高二者偶联体系的产物生成效率.

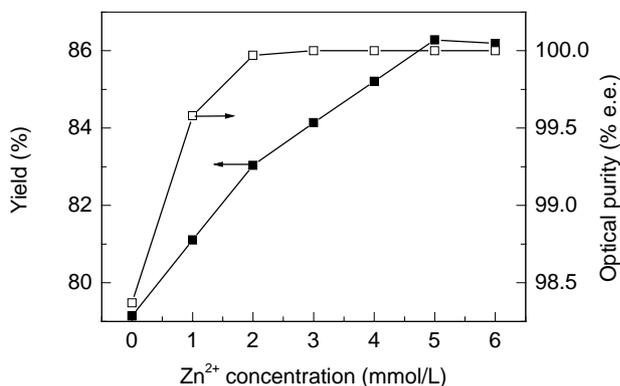


图7 Zn^{2+} 浓度对转化反应的影响

Fig.7 Effect of Zn^{2+} concentration on biotransformation reaction

4 结论

以 (R)-性羧基还原酶和甲酸脱氢酶偶联体系为生物催化剂, 研究了反应温度、pH 值、底物初始浓度、反应时间、细胞存在状态和 Zn^{2+} 浓度对产物合成效率的影响. 在所有影响因素中, 反应温度和 pH 值对生物转化反应的影响最大, Zn^{2+} 对产物得率有较好的促进作用. 研究表明, 在底物初始浓度 6 g/L、反应 pH 7.0、反应温度 35℃、反应时间 36 h、细胞湿重 10% 和 Zn^{2+} 浓度为 5 mmol/L 的反应条件下, 合成产物 (R)-苯基乙二醇光学纯度可达 100% e.e., 得率达 86.3%.

参考文献:

- [1] Groger H, Hummel W, Rollmann C, et al. Preparative Asymmetric Reduction of Ketones in a Biphasic Medium with an (S)-Alcohol Dehydrogenase under *in situ*-Cofactor-recycling with a Formate Dehydrogenase [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60: 633–640.
- [2] Andreas L, Murillo V F. Production of Fine Chemicals Using Biocatalysis [J]. *Curr. Opin. Biotech.*, 1999, 10(6): 595–603.
- [3] Weekbecker A, Hummel W. Improved Synthesis of Chiral Alcohols with *Escherichia coli* Cells Co-expressing Pyridine Nucleotide Transhydrogenase, NADP⁺-dependent Alcohol Dehydrogenase and NAD⁺-dependent Formate Dehydrogenase [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26: 1739–1744.
- [4] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, et al. Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow [J]. *Nature*, 2001, 409(1): 258–268.
- [5] Koeller K M, Wong C H. Enzymes for Chemical Synthesis [J]. *Nature*, 2001, 409(1): 232–240.
- [6] 孙莹, 张荣珍, 徐岩. (R)-专一性羧基还原酶与甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的共表达 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1629–1633.
- [7] 许娜, 王海燕, 聂尧, 等. 近平滑假丝酵母 (R)-专一性羧基还原酶基因的克隆与表达 [J]. *微生物学通报*, 2006, 33(4): 112–118.
- [8] Liese A, Karutz M, Kamphuis J, et al. Resolution of 1-Phenyl-1,2-ethanediol by Enantioselective Oxidation Overcoming Product Inhibition by Continuous Extraction [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 51: 544–550.
- [9] Radzicka A, Wolfenden R. A Proficient Enzyme [J]. *Science*, 1995, 6(267): 90–93.
- [10] Labrou N E, Rigden D J. Active-site Characterization of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase [J]. *Biochem. J.*, 2001, 354: 455–463.
- [11] Labrou N E, Rigden D J, Clonis Y D. Characterization of the NAD⁺ Binding Site of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase by Affinity Labelling and Site-directed Mutagenesis [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267: 6657–6664.
- [12] Kataoka M, Yamamoto K, Kawabata H. Stereoselective Reduction of Ethyl 4-Chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* Transformant Cells Co-expressing the Aldehyde Reductase and Glucose Dehydrogenase Genes [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51: 486–490.
- [13] Kizaki N. Synthesis of Optically Pure Ethyl (S)-4-Chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* Transformant Cells Co-expressing the Carbonyl Reductase and Glucose Dehydrogenase Genes [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55: 590–595.
- [14] Yamamoto H, Mitsuhashi K, Kimoto N, et al. A Novel NADH-dependent Carbonyl Reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and Comparison of NADH-regeneration System for the Synthesis of Ethyl (S)-4-Chloro-3-hydroxybutanoate [J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004, 68: 638–649.
- [15] 羊明, 徐岩, 穆晓清, 等. 近平滑假丝酵母 NAD(H) 依赖型次级醇脱氢酶的分离纯化及酶学性质 [J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(1): 121–125.
- [16] Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Villalobos-Molina R, et al. Diversity, Taxonomy and Evolution of Medium-chain Dehydrogenase/Reductase Superfamily [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270: 3309–3334.
- [17] Labrou N E, Rigden D J, Clonis Y D. Characterization of the NAD⁺ Binding Site of *Candida boidinii* Formate Dehydrogenase by Affinity Labelling and Site-directed Mutagenesis [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267: 6657–6664.
- [18] Radzicka A, Wolfenden R. A Proficient Enzyme [J]. *Science*, 1995, 6(267): 90–93.

Preparation of (*R*)-1-Phenyl-1,2-ethanediol by Biotransformation with a Coupled System of (*R*)-Specific Carbonyl Reductase and Formate Dehydrogenase

ZHANG Rong-zhen, XU Yan, GENG Ya-wei, WANG Shan-shan, SUN Ying

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

Abstract: The effects of reaction temperature, pH value, initial substrate concentration, reaction duration, cell concentration and forms on biotransformation reaction for preparation of (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol were studied with 2-hydroxyacetophenone and sodium formate as substrates and the whole cells of *E. coli* Rosetta/pETDuet-*rcr-fdh* as catalyst. The results showed that when the concentration of 2-hydroxyacetophenone was 6 g/L, (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol was produced with high optical purity of 98.37% enantiomeric excess and yield of 79.14% at the conditions of temperature 35°C, pH 7.0, reaction duration 36 h and wet cell concentration 10% (ω). Further research showed that the biotransformation efficiency could be well improved by addition of Zn^{2+} . In the presence of Zn^{2+} with a final concentration of 5 mmol/L, the enantiomeric excess and yield reached 100% and 86.3%, respectively.

Key words: recombinant *E. coli* strain; biotransformation; (*R*)-1-phenyl-1,2-ethanediol; enantiomeric excess; yield