

光控光合菌生物催化苯乙酮不对称还原的反应机理

王梦亮, 胡 锐, 郭学林, 闫甫昆, 刘滇生

(山西大学应用化学研究所, 山西太原 030006)

摘要:以苯乙酮作为模型底物,通过制备类球红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)的载色体和分离纯化的胞内氧化还原酶混合液,构建了以类球红杆菌全细胞为催化剂、氧化还原酶为催化剂以及载色体与氧化还原酶偶合三种不对称还原反应体系,并通过向反应体系中加入最适氢供体乙酸钠和电子供体硫代硫酸钠提高产物的转化收率.通过检测目标产物的收率、对映体过量(ee)值和光学构型,分析了光控不对称还原的生物催化机理,发现光照可以改变胞内(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶的活性,从而产生不同构型的产物,加入电子供体和氢供体后,反应收率和 ee 值提高的原因是由于分别补充了细菌叶绿素分子Bchl失去的电子和NADPH再生所需的活性氢.

关键词:类球红杆菌;氧化还原酶;光控不对称还原;苯乙酮;苯乙醇;载色体

中图分类号: O643 **文献标识码:** A

Mechanism of Light-Controlled Asymmetric Reduction of Acetophenone by Photosynthetic Bacteria

WANG Mengliang*, HU Rui, GUO Xuelin, YAN Fukun, LIU Diansheng

(Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China)

Abstract: A new kind of asymmetric hydrogenation reaction catalyzed by *Rhodobacter sphaeroides* and the reaction mechanism have been studied. The advantages are that coenzyme (NADPH) can be regenerated in situ by the photosynthetic electron-transfer reactions of photosynthetic bacteria relying on light energy, and ketone compounds can be chirally hydrogenated. Acetophenone was selected as the model substrate, and the whole cell catalytic system, the asymmetric reduction system of redox enzymes and the chromatophore coupled with redox enzymes system were built through preparation of chromatophore and isolation and purification of endocellular (S)-redox enzymes and (R)-redox enzymes of photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. This result indicates that these cells have the capacity of capturing light energy to generate NADPH through photosynthetic electron-transfer reactions and the relative enzymatic activities. (S)-redox enzyme and (R)-redox enzyme were largely influenced by the amount of light in the environment. Effect of the electron donors and hydrogen donors on chemical yield in the reaction system was determined. A novel method for stereochemical control of the asymmetric reduction by photosynthetic bacteria was also reported. Enantioselectivity in asymmetric reduction of acetophenone was improved by illumination with fluorescent light. As a result, the yield of asymmetric reduction reaction was largely improved through promoting coenzyme NADPH regeneration.

Key words: *Rhodobacter sphaeroides*; redox enzyme; light-controlled asymmetric reduction; acetophenone; phenylethyl alcohol; chromatophore

手性是生命系统的本质属性之一,含手性因素的化学药物有多种对映体,它们在人体内的药理活

性、代谢过程及毒性存在着显著差异^[1,2]. 光学活性醇是天然产物及手性药物合成中重要的手性砌块,

用化学方法对前手性芳香酮进行不对称还原是制备光学活性醇的重要途径^[3]。生物转化技术由于具有高效专一和绿色节能的特点在不对称合成中的应用越来越受到重视^[4,5]。作为生物催化剂的微生物细胞中含有许多具有立体选择性的酶,使用全细胞催化不对称合成反应,不但可以使价格昂贵的催化不对称还原的辅酶在胞内再生^[6],同时所有的酶和辅酶都被保护在天然的细胞环境中,有利于生物催化反应的进行。

目前用于前手性芳香酮不对称还原制备光学活性醇的催化细胞主要有酵母、植物细胞和蓝藻三种。Cheng 等^[7]以苯乙酮作为唯一的碳源,用土壤中分离得到的酵母 *Candida utilis* 催化苯乙酮生成(S)-苯乙醇,对映体过量(ee)值为 94.8%。但是,以活性酵母作为催化细胞时,为了使不对称还原反应所必需的辅酶在细胞内再生,需要添加葡萄糖等共底物,这影响了产物的分离和纯化,同时酵母细胞催化苯乙酮的转化率也不高。Yadav 等^[8]利用植物细胞催化该类前手性酮的不对称还原,但植物细胞培养困难并且转化效率较低。Nakamura 等^[9]首次利用光能营养型微生物蓝藻 *Synechococcus sp.* PCC 7942 在不加任何共底物的前提下,依靠光激发的光电子传递成功地对 2,3,4,5,6-氯苯乙酮进行了手性还原,获得了相应的手性醇,由于光能使 NADPH 再生,其反应的效率非常高。底物/生物催化剂比值达到 2.0(面包酵母只有 0.003~0.02),化学收率大于 90%,光学收率大于 99%。

我们在前期实验^[10]中筛选出一株能进行不放氧光合作用的类球红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*),发现其可以直接利用光能催化苯乙酮生成手性醇。在最优反应条件下,发酵培养基中产物的收率在 90% 以上,产物的光学纯度高达 99%。在此基础上,本文选用了同类研究中应用范围最广的苯乙酮作为模型底物,对光控不对称还原生物催化机理和在反应体系中加入氢供体和电子供体对产物收率的影响进行了较为深入的研究。

1 实验部分

1.1 类球红杆菌载色体的制备以及胞内(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶的分离纯化

载色体的制备参照文献[11]。菌种类球红杆菌为本实验室保存菌种,菌体培养至 OD₆₈₀ 为 1.0 时,用日立 CR22G 型高速冷冻离心机于 5 000 r/min 离

心收集菌体。用 Tris-HCl 缓冲液(10 mmol/L, pH 7.5)洗涤菌体 3 次,悬浮于 Tris-HCl 缓冲液中,在 4 °C 超声破碎混有玻璃粉的悬浮细胞,并在 Beckman Optima L-100XP 型超速冷冻离心机中以 30 000 r/min 离心 30 min 后取上清液,继续将此上清液在超速冷冻离心机中以 35 000 r/min 离心 60 min 得到载体结构沉淀,用适量 Tris-HCl 缓冲液将载体沉淀溶解下来,密封置于 -20 °C 冰箱中保存。

胞内(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶的分离纯化参照文献[12]。在 80 ml, pH 7.0 的磷酸缓冲液中加入 15 g 湿菌体,再加入 10 mmol/L 的巯基乙醇(Amresco, 保护还原酶中可能存在的二硫键)和苯甲基磺酰氟(PMSF, Amresco, 抑制蛋白酶的活性),利用 750 W(4 s 破胞 + 7 s 间歇冷切)×99 破胞,破胞液以 10 000 r/min 离心 25 min,收集上清液。在破胞离心后的上清液中加入 100 mg 的硫酸链霉素(Amresco)搅拌 30 min,再用 10 000 r/min 离心 25 min 去掉沉淀的核酸和其它杂质,收集上清液得到透明的淡黄色粗酶液。上述所有操作均在 4 °C 下完成,以保证酶活力。最后采用快速蛋白液相色谱系统 AKTA FPLC(安玛西亚中国有限公司)以阴离子交换柱 Mono Q HR 对粗酶液进一步分离纯化,得到(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶混合液。

1.2 氧化还原酶活力测定

向制备的酶混合液中加入 100% 浓度的饱和硫酸铵溶液缓慢搅动沉淀,离心,提取硫酸铵浓度为 40%~60% 的沉淀,透析制得纯酶制品,溶于磷酸缓冲液(pH 7.0, 0.05 mol/L),上述过程在 4 °C 下完成。取 20 μl 酶稀释液加入到含有 10 μl 苯乙酮和 40 μl NADPH(0.025 mol/L, Roche)的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0, 0.05 mol/L)中,用分光光度计(Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences)在 1 ml 比色皿中精确测定酶活力,10 s 测定一次。还原型辅酶 II(NADPH)作为供体给氢,在不对称还原过程中被氧化为 NADP⁺,而 NADPH 在 340 nm 的紫外光下有最大吸收,根据吸光度的变化测定酶活力,酶活力定义为单位时间内催化氧化 NADPH 能力的大小,其计算公式为 $U(U/\text{mg}\cdot\text{min})=(\Delta A_{340} V)/(6.2 m)$,其中 m 表示蛋白质质量(mg)。

1.3 光控不对称还原反应体系构建及产物分析

在 250 ml 的三角瓶中加入 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L)100 ml 和 17 mmol/L 的底物苯乙

酮(中国医药集团上海化学试剂公司),分别构建全细胞催化的不对称还原反应体系、(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶作为催化剂的不对称还原反应体系以及载色体与胞内氧化还原酶偶合的不对称还原反应体系,在 30 ℃ 条件下,150 r/min 振荡培养 24 h. 反应结束后,将反应液以 4 000 r/min 离心,留取上清液,然后加入 NH₄Cl 至饱和,再用 8 ml 乙醚萃取两次,合并萃取液,无水 MgSO₄ 干燥后,减压蒸馏得到产品.

用 GC-7900 型气相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司)分析蒸馏得到的产品,氢火焰离子检测器,CP Chirasil-DEX 手性柱(25 m × 0.25 mm,安捷伦),柱前压为 0.2 MPa,进样器和检测器温度均为 250 ℃. 采用柱程序升温,柱温 150 ℃ 维持 1 min,30 ℃/min 升至 180 ℃,维持 2 min,载气为氮气,进样量为 0.3 μl. 用 D-7900 色谱数据工作站进行数据处理. 底物转化率定义为 $X = m_P M_S / (m_S M_P)$, 式中 M_P 和 M_S 分别代表产物醇和底物酮的分子量, m_S 和 m_P 分别代表反应初始时底物的质量和产物的质量. 产物的对映体过量值定义为 $ee = (c_S - c_R) / (c_S + c_R)$, 其中 c_S 和 c_R 分别为 S 型产物和 R 型产物的浓度,采用外标法对产物进行分析.

2 结果与讨论

2.1 氧化还原酶活力的测定结果

经测定,从类球红杆菌细胞中分离纯化的胞内(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶混合液不对称催化还原底物苯乙酮的酶活力为 42.0 U/(mg · min),其性质与文献[13]报道的乙醇脱氢酶相似,可初步认为分离纯化的类球红杆菌胞内酶是一种不对称还原苯乙酮的酶. 在还原过程中通过 NADPH 进行氢质子传递完成对底物苯乙酮的不对称还原,

这在酶水平上进一步研究光控不对称还原生物催化机理奠定了基础.

2.2 全细胞催化的光控不对称还原反应体系的构建

为了研究光控不对称还原反应的生物催化机理,首先选用类球红杆菌作为全细胞生物催化剂,在反应体系中加入氢供体乙酸钠和电子供体硫代硫酸钠,考察反应活性的变化(表 1),并且通过加入光电子传递抑制剂 DCMU(3-(3,4-二氯苯基)-1,1-二甲基脲)研究光能微生物辅酶的胞内再生机制.

从表 1 的实验 1 和 2 可以看出,以全细胞作为生物催化剂时产物苯乙醇的光学构型受光照条件的影响. 在有光照条件下可获得光学纯度高达 94.2% 的(S)-苯乙醇,产物的收率为 63.3%. 但是在黑暗条件下产物以(R)-苯乙醇为主,其光学纯度为 66.9%,收率仅为 26.1%. 在实验 3 中加入最适电子供体硫代硫酸钠后,产物的收率提高至 75.6%,当同时加入电子供体和氢供体时(实验 5),产物的收率大幅度提高至 82.6%. 在黑暗条件下,与实验 2 相比,尽管同时加入电子供体和氢供体,实验 4 和 6 的收率及 ee 值未见明显提高. 由此可知,光照能提供辅酶再生所必需的光电子,从而提高反应的收率,电子供体可以及时补充激发态细菌叶绿素分子 Bchl* 失去的电子,而氢供体则为 NADP⁺ 还原成 NADPH 提供活性氢.

为了进一步说明光照对全细胞光控不对称还原催化体系的影响,在反应体系中加入能抑制光电子传递的抑制剂 DCMU^[14]. 实验 7 表明,在加入 DCMU 后,虽然在光照条件下同时加入了电子供体和氢供体,但是产物的收率与实验 6 黑暗条件下的相比没有明显的提高. 这是因为 DCMU 抑制了辅酶再生必需的光电子传递,从而造成收率较低. 但是

表 1 全细胞催化不对称还原苯乙酮反应

Table 1 Asymmetric reduction of acetophenone by *Rhodobacter sphaeroides* whole cells

Entry	Light	Addition of reactants (mmol/L)			Yield (%)	ee (%)	Configuration
		Sodium thiosulfate	Sodium acetate	DCMU*			
1	on	0	0	0	63.3	94.2	S
2	off	0	0	0	26.1	66.9	R
3	on	10	0	0	75.6	97.2	S
4	off	10	0	0	24.1	67.8	R
5	on	10	10	0	82.6	98.1	S
6	off	10	10	0	30.1	64.7	R
7	on	10	10	0.5	41.1	96.6	S

Reaction conditions: 100 ml Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 7.0), acetophenone 17 mmol/L, $\theta = 30$ ℃, $t = 24$ h.

* 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea.

加入 DCMU 后产物的光学构型却是 *S* 型, 并且光学纯度高达 96.6%。由此可知, 在全细胞催化的不对称还原反应体系中, 光照影响了细胞内(*S*)氧化还原酶和(*R*)氧化还原酶的酶活力, 从而对产物的光学构型起到了调控作用。

2.3 (*S*)氧化还原酶和(*R*)氧化还原酶为催化剂的不对称还原反应体系的构建

为进一步阐明光照的作用, 选用分离纯化的胞内(*S*)氧化还原酶和(*R*)氧化还原酶混合液作为生物催化剂构建了不对称还原反应体系, 结果如表 2 所示。可以看出, 在加入 NADPH 时, 光照条件下

(实验 1)产物的收率为 35.1%, 比黑暗条件下(实验 2)产物的收率(6.2%)有很大程度的提高, 而且光学纯度从 70.9% 提高至 94.9%, 但产物为(*S*)-苯乙醇。这是由于在 NADPH 存在的条件下, 光照激活了光能微生物细胞内的(*S*)氧化还原酶, 使其活性大大超过了(*R*)氧化还原酶的活性。在同时加入 NADP⁺、电子供体和氢供体时(实验 4 和 5), 无论是光照还是黑暗条件下产物的收率均无明显变化。这可能是由于纯化的酶混合液中没有能进行电子传递的载色体存在, 因此无法完成辅酶 NADPH 的再生。

表 2 氧化还原酶催化不对称还原苯乙酮反应

Table 2 Asymmetric reduction of acetophenone by redox enzymes from *Rhodobacter sphaeroides* cells

Entry	Light	Addition of reactants (mmol/L)				Yield (%)	ee (%)	Configuration
		Sodium thiosulfate	Sodium acetate	NADPH	NADP ⁺			
1	on	0	0	13	0	35.1	94.9	<i>S</i>
2	off	0	0	13	0	6.2	70.9	<i>R</i>
3	on	0	0	0	15	10.5	98.2	<i>S</i>
4	on	10	10	0	15	18.7	97.1	<i>S</i>
5	off	10	10	0	15	10.4	68.8	<i>R</i>

Reaction conditions: 100 ml Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 7.0), acetophenone 17 mmol/L, $\theta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 24\text{ h}$.

2.4 载色体与氧化还原酶偶合不对称还原体系的构建

在上述实验的基础上, 选用类球红杆菌载色体偶合氧化还原酶作为生物催化剂构建了不对称还原体系, 以进一步阐明反应体系中辅酶 NADPH 的再生机理, 结果见表 3。可以看出, 同时在体系中加入

NADP⁺、电子供体和氢供体后, 由实验 1 和 2 比较可知, 光照使产物的收率由 13.2% 大幅度提高至 78.2%, ee 值由 72.9% 提高至 95.2%, 并且由表 2 实验 4 与表 3 实验 1 的收率比较可知, 光照和载色体在类球红杆菌胞内光电子传递辅酶原位再生的过程中起到了决定性的作用。

表 3 载色体与氧化还原酶偶合不对称还原苯乙酮反应

Table 3 Asymmetric reduction of acetophenone by chromatophors coupled with redox enzymes from *Rhodobacter sphaeroides*

Entry	Light	Addition of reactants (mmol/L)				Yield (%)	ee (%)	Configuration
		Sodium thiosulfate	Sodium acetate	NADPH	NADP ⁺			
1	on	10	10	0	15	78.2	95.2	<i>S</i>
2	off	10	10	0	15	13.2	72.9	<i>R</i>
3	off	10	10	13	0	28.1	66.8	<i>R</i>

Reaction conditions: 100 ml Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 7.0), acetophenone 17 mmol/L, chromatophore 0.2 g/ml, redox enzymes 2.5 ml, $\theta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 24\text{ h}$.

2.5 光控不对称还原生物催化机理

根据上述实验结果推测的类球红杆菌催化苯乙酮不对称还原的反应机理如图 1 所示。首先, 在光照条件下, 位于细胞膜载色体上的捕光色素将吸收的光量子传递到光化学反应中心的细菌叶绿素分子 Bchl 上, Bchl 吸收一个光量子后由基态转变成激发态 Bchl*。Bchl* 分子释放的高能电子经过非循环式光电子传递链传递, 将 NADP⁺ 还原为不对称还原反应必需的辅酶 NADPH。通过加入电子供体和氢

供体的方式分别补充 Bchl 失去的电子和 NADPH 再生所需的活性氢。这正是所研究的反应体系中载色体或全细胞存在时, 加入乙酸钠和硫代硫酸钠后, 产物的收率和 ee 值大幅度提高的原因。光照使得细胞内(*S*)氧化还原酶的活性远高于(*R*)氧化还原酶, 因此细胞内再生的辅酶 NADPH 优先被细胞内的(*S*)氧化还原酶所利用; 而黑暗条件下(*S*)氧化还原酶未被激活, 无法大量结合辅酶 NADPH, 细胞内(*S*)氧化还原酶和(*R*)氧化还原酶活性差异

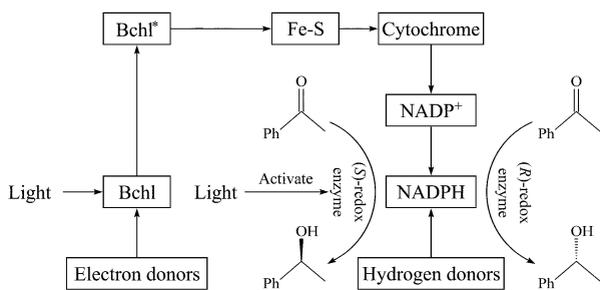


图 1 类球红杆菌光控苯乙酮不对称还原反应体系的催化机理

Fig 1 The mechanism of asymmetric reduction of acetophenone catalyzed by photosynthetic bacteria

(Bchl — bacteriochlorophyll, Bchl* — excited state of bacteriochlorophyll, Fe-S — ferredoxin.)

不大,结合 NADPH 的能力也相近,因此反应的 ee 值较低,产物以(R)-苯乙醇为主,同时由于没有辅酶 NADPH 再生所必需的光能供应,反应的收率也较低.

另外,再生的辅酶 NADPH 能提供反应所需要的氢,在氧化还原酶的作用下从底物苯乙酮的 R 或 S 面进攻羰基生成相应的单一对映体醇(图 2),同时辅酶被转化成氧化型的 NADP⁺.

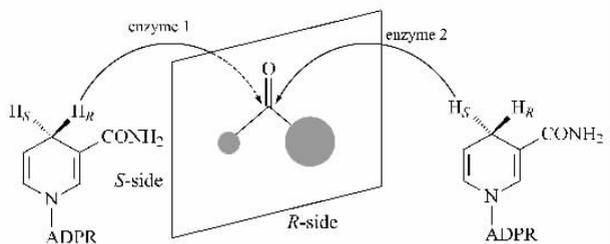


图 2 胞内氧化还原酶结合辅酶 NADPH 生成不同构型产物示意图

Fig 2 Asymmetric reduction of acetophenone to (S) or (R) product catalyzed by redox enzymes and NADPH

3 结论

通过对类球红杆菌全细胞为催化剂、氧化还原

酶混合液为催化剂以及载体与氧化还原酶偶合催化三种不对称还原反应体系的构建和研究,通过检测目标产物的收率、ee 值和光学构型,分析了光控不对称还原的生物催化机理,发现光照可以改变胞内(S)-氧化还原酶和(R)-氧化还原酶的活性,从而生成不同构型的产物,阐明了加入电子供体和氢供体后反应收率和 ee 值的提高是由于分别补充细菌叶绿素分子 Bchl 失去的电子和 NADPH 再生所需的活性氢.

参 考 文 献

- 1 Thamas W. *Tetrahedron*, 1999, **55**(1):1
- 2 Wandrey C, Liese A, Kihumbu D. *Org Process Res Dev*, 2000, **4**(4):286
- 3 Wills M. *Chem Soc Rev*, 1995, **24**(3):177
- 4 Santaniello E, Ferraboschi P, Grisenti P, Manzocchi A. *Chem Rev*, 1992, **92**(5):1071
- 5 Wei Z L, Li Z Y, Lin G Q. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**(2):229
- 6 Yang F X, Russell A J. *Biotechnol Progr*, 1993, **9**(3):234
- 7 Cheng C Y, Ma J H. *Process Biochem*, 1996, **31**(2):119
- 8 Yadav J S, Nanda S, Reddy P T, Rao A B. *J Org Chem*, 2002, **67**(11):3900
- 9 Nakamura K, Yamanaka R, Tohi K, Hamada H. *Tetrahedron Lett*, 2000, **41**(35):6799
- 10 王梦亮,杜刚,刘滇生. 高等学校化学学报(Wang M L, Du G, Liu D Sh. *Chem J Chin Univ*), 2006, **7**(9):1686
- 11 Clayton R K. *Photochem Photobiol*, 1966, **5**(8):669
- 12 Yamamoto H, Matsuyama A, Kobayash Y. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**(2):481
- 13 Hildebrandt P, Riermeier T, Altenbuchner J, Bornscheuer U T. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**(8):1207
- 14 Trebst A. *Methods Enzymol*, 1980, **69**:675

(Ed LN)