

## 研究报告

## 芳香杂环酮还原酶的基因挖掘及催化性质

薛佳钰, 许国超\*, 倪晔

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

薛佳钰, 许国超, 倪晔. 芳香杂环酮还原酶的基因挖掘及催化性质[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4416-4428.

XUE Jiayu, XU Guochao, NI Ye. Gene mining and characterization of an aromatic heterocyclic ketone reductase from *Modestobacter roseus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4416-4428.

**摘要:**【背景】(R,S)-2-氯-1-(6-氟-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基)-乙醇[NEB-8(R,S)]是奈必洛尔的重要手性中间体, 由芳香杂环酮还原酶不对称合成。目前的天然酮还原酶催化效率低、对映选择性差, 而商业酮还原酶来源不明确、反应转化率低。【目的】研究具有高对映选择性、稳定性良好、催化效率优异的酮还原酶实现 NEB-8(R,S)的高效不对称合成。【方法】基于已有的酮还原酶的蛋白质序列, 通过基因挖掘, 获得了来源于玫瑰谦虚杆菌(*Modestobacter roseus*)的酮还原酶基因 *mradh*, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行了表达, 测定其对映选择性, 表征其酶学性质, 并优化其在高浓度底物下的反应。【结果】筛选获得了一种新型酮还原酶 *MrADH*, 其属于中链醇脱氢酶超家族, 兼具氧化和还原能力。*MrADH* 的氧化、还原活性的最适 pH 值分别为 9.5 和 7.0; 对于酮酯类底物、间位取代芳香酮、杂环酮和仲醇等底物, *MrADH* 具有良好的还原氧化活性; 此外, 在 40 °C 条件下, *MrADH* 半衰期可长达 207.0 h, 显示出良好的热稳定性。*MrADH* 能够高效地催化还原 600 mmol/L 的 (S)-2-氯-1-(6-氟-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基)-乙酮, 以接近 100% 的对映体过量(*e.e.*)和 99.7% 的转化率合成产物醇。【结论】来源于 *M. roseus* 的酮还原酶可以高效合成高光学纯度的盐酸奈必洛尔中间体, 为奈必洛尔的合成奠定了基础。

**关键词:** 基因挖掘; 芳香杂环酮还原酶; 高立体选择性; *MrADH*; 奈必洛尔

资助项目: 国家自然科学基金(22378169)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22378169).

\*Corresponding author. E-mail: guochaoxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-04-12; Published online: 2024-05-13

# Gene mining and characterization of an aromatic heterocyclic ketone reductase from *Modestobacter roseus*

XUE Jiayu, XU Guochao\*, NI Ye

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] (*R,S*)-2-chloro-1-(6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-yl)-ethanol [NEB-8(*R,S*)] is an important chiral intermediate for the synthesis of nebivolol. It is synthesized by asymmetric reduction of aromatic heterocyclic ketones under the catalysis of ketoreductase. However, the low catalytic efficiency and poor enantioselectivity of natural ketoreductases and the unclear source of commercial ketoreductases result in low conversion rates. [Objective] To develop a new method for the asymmetric synthesis of NEB-8(*R,S*) with high enantioselectivity, good stability, and high catalytic efficiency. [Methods] We mined a ketoreductase gene *mradh* from *Modestobacter roseus* based on the existing protein sequences of ketoreductases, expressed this gene in *Escherichia coli* BL21(DE3), and determined the enantioselectivity of the protein. Furthermore, we characterized the enzymatic properties and optimized its reaction conditions under high concentrations of substrate. [Results] In this study, a novel ketoreductase *MrADH* was identified which belongs to the medium-chain alcohol dehydrogenase superfamily and exhibits both oxidative and reductive activities. The oxidation and reduction activities of *MrADH* were the highest at pH 9.5 and pH 7.0, respectively. *MrADH* had good reduction and oxidation activities for ketoesters, meta-substituted aromatic ketones, heterocyclic ketones, and secondary alcohols. In addition, it had a half-life of up to 207.0 h at 40 °C, demonstrating good thermal stability. *MrADH* efficiently catalyzed the reduction of 600 mmol/L (*S*)-2-chloro-1-(6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-yl)-ethanone to synthesize the product alcohol with the enantiomeric excess (*e.e.*) near 100% and a conversion rate of 99.7%. [Conclusion] The ketoreductase from *M. roseus* can efficiently synthesize high-optical purity intermediate of nebivolol hydrochloride, laying a foundation for the synthesis of nebivolol hydrochloride.

**Keywords:** gene mining; aromatic heterocyclic ketone reductase; high stereoselectivity; *MrADH*; nebivolol

(*R,S*)-2-氯-1-(6-氟-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基)-乙醇[(*R,S*)-2-chloro-1-(6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-yl)-ethanol, NEB-8(*R,S*)] 是一种重要的手性芳香杂环醇, 作为关键手性中间体用于合成奈必洛尔。奈必洛尔是一种非内在拟交感神经活性的第三代选择性  $\beta_1$ -肾上腺素受体( $\beta_1$ -AR)阻滞剂, 广泛用于治疗原发性高血压和充血性心力衰竭, 并能在体外通过调节

一氧化氮(NO)机制发挥血管舒张和血小板抑制作用。鉴于其重要的药用特性, 高效且环保地合成具有高光学活性的 NEB-8(*R,S*)显得尤为重要。目前, 合成手性芳香杂环醇的方法主要包括直接化学合成、化学动力学拆分和生物不对称还原。其中, 生物不对称还原因其高化学和光学纯度、理论上的 100%得率、避免使用有毒试剂和简化反应条件而脱颖而出。相较于其他

合成途径,这种方法不仅经济高效,而且非常适合工业化大规模生产。因此,利用生物还原不对称合成 NEB-8(*R,S*)是当前最理想的选择,有助于推动奈必洛尔的可持续生产和广泛应用<sup>[1-3]</sup>。

传统上,盐酸奈必洛尔的不对称还原通常是在环己烷的非极性溶液中,利用有机手性试剂(*R*)-2-甲基-恶唑硼烷与硼烷络合物-硼烷二乙基苯胺( $\text{BH}_3 \cdot \text{DEA}$ )进行相互作用,以还原(*S*)-2-氯-1-(6-氟-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基)-乙酮[(*S*)-2-chloro-1-(6-fluoro-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-yl)-ethanone, NEB-7S], 3.7 h内能达到90%的转化率,对映体过量为98%<sup>[4]</sup>。此外,有机铝盐也可与异丙醇和非质子弱极性溶剂结合,用于还原75.5 g/L的NEB-7S,在3 h内收率为91.6%,对映异构体纯度达到97.6%<sup>[5]</sup>。然而,化学合成NEB-8(*R,S*)的方法存在诸多缺点,如手性催化剂成本高、分离率低、分离步骤烦琐、转化率不高及选择性难以控制等。相比之下,利用酮还原酶(CR)或醇脱氢酶(ADH)进行生物催化不对称还原合成手性NEB-8(*R,S*)展现出更大的潜力,其提供了一种更为简便的手性醇合成路线,使用符合绿色生产的实验条件,以优异的产率获得良好光学活性的对映体纯醇。例如, Jas等<sup>[6]</sup>采用商业化的(*R*)-ADHs合成NEB-8(*R,S*),在底物负载量为38 g/L时,对映体过量值超过99%,产率为93%–99%。同样地,蒲通等<sup>[7]</sup>采用RorRADH对NEB-7S进行不对称还原,得到NEB-8(*R,S*),产率为90%–99%,对映体过量值超过99.2%。因此NEB-8(*R,S*)的生物催化不对称合成受到商业酶成本高、底物耐受性低和催化效率低的阻碍。

本研究运用基因组数据挖掘策略,选取5个不同来源的假定芳香杂环酮还原酶,对来源于红细菌科温和杆菌属(*Modestobacter roseus*)的酮还原酶MrADH的还原活力和对映选择性,以

及可溶性表达进行研究。为了进一步拓展MrADH的应用潜力,对其酶学性质进行深入研究,包括最适温度、最适pH值、温度稳定性、有机溶剂耐受性、金属离子影响及底物谱。此外,还在高底物浓度下进行还原反应,以评估其工业化应用的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

本研究所用到的菌株和质粒:酮还原酶来源于赤红球菌(*Rhodococcus ruber*)、嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*)、昏暗地嗜皮菌(*Geodermatophilus obscurus*)、玫瑰谦虚杆菌(*M. roseus*)、嗜热纤维菌(*Thermobifida cellulositica*)、人参雌植菌(*Herbiconiux ginsengi*),酮还原酶基因由天霖生物有限公司全基因合成,*Escherichia coli* BL21(DE3)和质粒pET-28a,由本实验室保存。

### 1.2 培养基

LB液体培养基(g/L):胰蛋白胨10.0,酵母提取物5.0,氯化钠10.0,121 °C灭菌20 min; LB固体培养基(g/L):胰蛋白胨10.0,酵母提取物5.0,氯化钠10.0,琼脂粉20.0,121 °C灭菌20 min<sup>[8]</sup>。

### 1.3 主要试剂和仪器

Oxid 胰蛋白胨和酵母提取物粉末,赛默飞世尔科技公司;氯化钠,上海泰坦科技股份有限公司;琼脂,白鲨生物公司;NADH/NAD<sup>+</sup>,邦泰生物工程(深圳)有限公司;Bradford试剂和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准溶液,生工生物工程(上海)股份有限公司;正己烷、异丙醇、乙醇和甲醇(色谱级),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;卡那霉素和异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG),上海捷瑞生物工程有限公司;氯化锌,北京沃凯生物科技有限公司;

免封闭 PAGE 凝胶快速制备试剂盒, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司。NanoDrop 微量分光光度计, 赛默飞世尔科技公司; 多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司; 蛋白电泳装置, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司<sup>[9]</sup>。

#### 1.4 酮还原酶的克隆与表达

以 *MrADH* 为例详述酮还原酶的表达过程。将 1  $\mu\text{L}$  (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 的 pET28a-*MrADH* 质粒转化到感受态 *E. coli* BL21(DE3) 中, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后将适量的菌液均匀涂布于 LB 平板上, 培养过夜; 挑取形态良好的单菌落, 接种到 40 mL 的 LB 培养基中(含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡那霉素), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 6–8 h; 随后, 将 1% 的接种液转移到 100 mL 的 LB 培养基中, 培养至  $OD_{600}$  为 0.8 时加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 并将温度降至 16  $^{\circ}\text{C}$  以诱导 *MrADH* 的表达; 经过 12–14 h 的培养后于 8 000 r/min 离心 3 min 收集菌体<sup>[9]</sup>。

为了纯化 *MrADH*, 将菌体沉淀悬浮于结合缓冲液 A 液(pH 7.4, 50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L  $\text{NaCl}$ ) 中。采用超声(功率 300 W, 工作 2 s、间歇 3 s, 持续 15 min)破碎细胞, 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清。将 *MrADH* 的粗酶液添加到 Ni-NTA-Sefinose 柱中, 并用洗脱液 B 液(50–500 mmol/L) 梯度洗脱。洗脱结束后采用 SDS-PAGE 观察洗脱蛋白纯度。使用超滤管对 *MrADH* 进行浓缩和脱盐, 储存在 pH 7.0 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中。使用 NanoDrop 微量分光光度计测定蛋白浓度<sup>[10]</sup>。

#### 1.5 还原氧化活力的测定

还原活力的测活(200  $\mu\text{L}$ ): 磷酸缓冲盐溶液(PBS, 100 mmol/L, pH 7.0), 2 mmol/L NEB-7S 或

苯乙酮, 0.75 mmol/L NADH, 0.5 mmol/L  $\text{ZnCl}_2$ , 10  $\mu\text{L}$  合适浓度的酶液。充分振荡混匀, 检测 3 min 内 340 nm 处吸光值的变化。

氧化活力的测活(200  $\mu\text{L}$ ): 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(Gly-NaOH, 100 mmol/L, pH 9.0), 异丙醇, 2 mmol/L  $\text{NAD}^+$ , 0.5 mmol/L  $\text{ZnCl}_2$ , 10  $\mu\text{L}$  合适浓度的酶液。充分振荡混匀, 检测 3 min 内 340 nm 处吸光值的变化。

酶活力单位(U)定义: 1 min 氧化 1  $\mu\text{mol}$  NADH/还原 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD}^+$  所需要的酶量<sup>[8]</sup>。

酶活力计算如公式(1)所示:

$$\text{酶活力(U)} = \frac{EW \times V \times 10^3}{6220 \times l} \quad (1)$$

式(1)中:  $EW$  为 1 min 内 340 nm 处的吸光度变化值;  $V$  为反应体系总体积(mL); 6 220 为 NADH 摩尔消光系数(L/(mol·cm));  $l$  为光程长度(cm)<sup>[8]</sup>。

比活力计算如公式(2)所示:

$$\text{比活力} = \frac{\text{酶活力(U)}}{\text{酶液体积} \times \text{蛋白浓度}} \quad (2)$$

式(2)中: 比活力单位为 U/mg; 酶液体积单位为 mL; 蛋白浓度单位为 mg/mL。

粗酶蛋白浓度测定采用考马斯亮兰法(Bradford), 以小牛血清白蛋白 BSA 为标准品参考<sup>[11]</sup>。

#### 1.6 产物对映选择性的测定

酮还原酶对映选择性测定的总反应体系为 1 mL, 包括 5 mmol/L NEB-7S, 0.5 mmol/L  $\text{NAD}^+$ , 0.5 mmol/L  $\text{ZnCl}_2$ , PBS 缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0), 5% (体积分数)的异丙醇, 500  $\mu\text{L}$  合适浓度的粗酶液。

正相检测采用色谱柱 OD-H (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相是正己烷:异丙醇=95:5; 波长: 210 nm; 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速: 1 mL/min。RT (NEB-7S)=11.913 min, RT [NEB-8(S,S)]=10.373 min, RT [NEB-8(R,S)]=14.372 min。

立体选择性 *e.e.* 计算如公式(3)所示:

$$e.e. (\%) = \frac{A_S - A_R}{A_S + A_R} \times 100 \quad (3)$$

式(3)中:  $A_S$  为产物 NEB-8(S,S)的峰面积;  $A_R$  为产物 NEB-8(R,S)的峰面积。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因挖掘、重组菌株的构建及筛选

酮还原酶 *RrADH* 源自赤红球菌(*R. ruber*), 它展现出对助溶剂(特别是丙酮和异丙醇)的出色耐受性, 可以耐受高达 50%丙酮和 80%异丙醇, 甚至可以耐受 99%的己烷<sup>[12-14]</sup>。这些有机溶剂不仅有效地促进了更多疏水性酮底物的溶解, 而且还能够作为酮还原酶的辅底物, 在氧化还原反应中提供循环动力。通过这种方法, *RrADH* 不需要外源的辅因子再生系统(如甲酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶等), 就可以原位再生烟酰胺辅因子, 避免了由于双酶比例不恰当而影响反应效率, 或造成酶催化剂的浪费, 也避免了额外添加酸碱滴定剂, 从而简化实验操作, 更加拓宽了其应用范围<sup>[15-16]</sup>。*RrADH* 的底物谱相当广泛, 能够催化多种醇-酮之间的氧化还原反应, 在含有高达 50%异丙醇的条件下, 它能够还原浓度高达 126 g/L 的潜手性酮, 不对称合成(S)-6-甲基-5-庚烯-2-醇, 此外, *RrADH* 同样适用于芳香族、脂肪族甲基酮、稠合双环酮以及  $\alpha,\beta$ -不饱和底物的还原, 展现出其多样性和实用性<sup>[13]</sup>。Arnold 的研究表明, 蛋白质在有机溶剂中的稳定性可能由其表面疏水残基的比例及蛋白质内部稳定相互作用的数量所决定。盐桥在非水介质中对酶稳定性起着重要的作用<sup>[17-18]</sup>。Korkhin 等<sup>[19]</sup>和 Karabec 等<sup>[20]</sup>分析表明 *RrADH* 和 *TbADH* 的晶体结构, 发现 *RrADH* 中 A-B 和 C-D 之间的二聚体界面均由 10 个盐桥连接, 这可能是其有机溶剂耐受性较高的原因之一。

在酶的基因挖掘中, 当序列相似性为 40%–80%时, 这些基因所编码的酶通常既保留了与探针酶相似的功能基础, 还可能展现出一些探针酶所不具备的独特性质或优势, 这可能影响到酶的底物特异性、催化效率、稳定性或其他方面的特性。因此, 本研究以 *RrADH* 为基因挖掘的探针酶, 将其蛋白质序列在 NCBI 数据库中对比后选取了 5 个未经报道过的与 *RrADH* 序列相似性为 50%–80%的基因进行表达和筛选, 具体信息见表 1。

五种假定的羰基还原酶 SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示, 除 *RpADH* 表达量较少外, 其余均得到表达。活力和对映选择性分析显示仅有来源于 *M. roseus* 的酮还原酶(*MrADH*)可以检测到对异丙醇和苯乙酮有相对较高的氧化活力(2.01 U/mg)和还原活力(0.51 U/mg), 以及接近 100%的高对映选择性。因此, *MrADH* 是可以利用异丙醇进行底物偶联原位辅酶再生和具有极佳手性的芳香杂环酮还原酶。为了进一步拓展 *MrADH* 在手性醇合成中的应用, 本研究对其进行了蛋白纯化和酶学性质表征, 并考察了其在高底物浓度下的不对称还原反应。

### 2.2 *MrADH* 的蛋白序列分析

辅酶依赖型醇脱氢酶在序列上展现出多样性, 可细分为短链脱氢酶(short-chain dehydrogenase, SDR)、中链脱氢酶(medium-chain dehydrogenases, MDR)和醛酮还原酶(aldo-keto reductases, AKR)。其中, MDR 主要依赖于锌离子, 具有 2 个高度保守的结构域:(1) 位于 C 端的参与 NAD(P)<sup>+</sup> 结合的 Rossmann 折叠域, 其以  $\beta$ - $\alpha$  的形式存在, 并具有典型的 GXGXXG 辅因子结合序列;(2) 位于 N 端的催化域, 与 GroES 具有远程同源性。MDR 通常以二聚体或四聚体的形式发挥活性, 每个亚基都含有 2 个紧密结合的锌

表 1 通过基因数据挖掘获得的酮还原酶的信息及筛选结果

Table 1 Information and screening result of alcohol dehydrogenases selected by gene mining

Item	<i>RpADH</i>	<i>GoADH</i>	<i>MrADH</i>	<i>TcADH</i>	<i>HgADH</i>
来源菌株 Source strain	<i>R. pyridinivorans</i>	<i>G. obscurus</i>	<i>M. roseus</i>	<i>T. cellulositytica</i>	<i>H. ginsengi</i>
GenBank 登录号 GenBank accession number	WP_024100401.1	WP_012949716.1	WP_153361988.1	WP_068756480.1	WP_092556727.1
碱基数 Number of bases (bp)	1 050	1 050	1 044	1 050	1 044
相对分子量 Relative molecular weight (kDa)	38.5	38.5	38.3	38.5	38.3
序列相似性 Sequence similarity (%)	75.63	61.64	60.74	58.84	62.31
异丙醇比活力 Specific activity to isopropanol (U/mg)	0.26±0.03	n.d.	2.01±0.10	n.d.	0.28±0.02
NEB-7S 比活力 Specific activity to NEB-7S (U/mg)	0.92±0.03	n.d.	3.60±1.30	n.d.	1.06±0.04
对映体过量 <i>e.e.</i> (%)	92.1	94.2	>99.9	48.0	96.5

n.d.: 未检测到活力

n.d.: No activity detected.



图 1 以 *RrADH* 为探针挖掘的 5 个酮还原酶的 SDS-PAGE 分析 1: *MrADH* 上清, 2: *MrADH* 沉淀; 3: *HgADH* 上清, 4: *HgADH* 沉淀; 5: *TcADH* 上清, 6: *TcADH* 沉淀; 7: *RpADH* 上清, 8: *RpADH* 沉淀; 9: *GoADH* 上清, 10: *GoADH* 沉淀

Figure 1 SDS-PAGE analysis of five ketone reductases mined with *RrADH* as a probe. 1: Supernatant of *MrADH*; 2: Precipitant of *MrADH*; 3: Supernatant of *HgADH*; 4: Precipitant of *HgADH*; 5: Supernatant of *TcADH*; 6: Precipitant of *TcADH*; 7: Supernatant of *RpADH*; 8: Precipitant of *RpADH*; 9: Supernatant of *GoADH*; 10: Precipitant of *GoADH*.

原子, 分别为活性位点的催化锌和催化结构域前方的结构锌。催化锌通常由 1 个组氨酸、2 个半胱氨酸和 1 个水分子配位, 而结构锌则通过 4 个半胱氨酸配位, 对亚基间的相互作用起到稳定作用。将 *MrADH* 的氨基酸序列提交至 NCBI 数据库进行 CD-search 后, 结果显示其属于 MDR 超家族。我们进一步从数据库中选取了同属于 MDR 超家族的同源酶(分别为 *ADH-D*, PDB 为 2H6E\_A; *SsADH*, PDB 为 1R37\_A; *PaADH*, PDB 为 NP\_559727; *SaADH*, PDB 为 Q4J781.1), 并进行了多序列比对, 结果如图 2 所示。

尽管 *MrADH* 与这些同源酶在一级序列上存在一定差异, 但其在二级结构上仍表现出高度保守性, 包括 NAD(H)结合域、催化锌离子与结构锌离子结合位点(实心箭头处为催化锌离子结合位点: Cys39, His63 和 Asp154, 空心箭头处为结构锌离子结合位点: Cys93、96、99

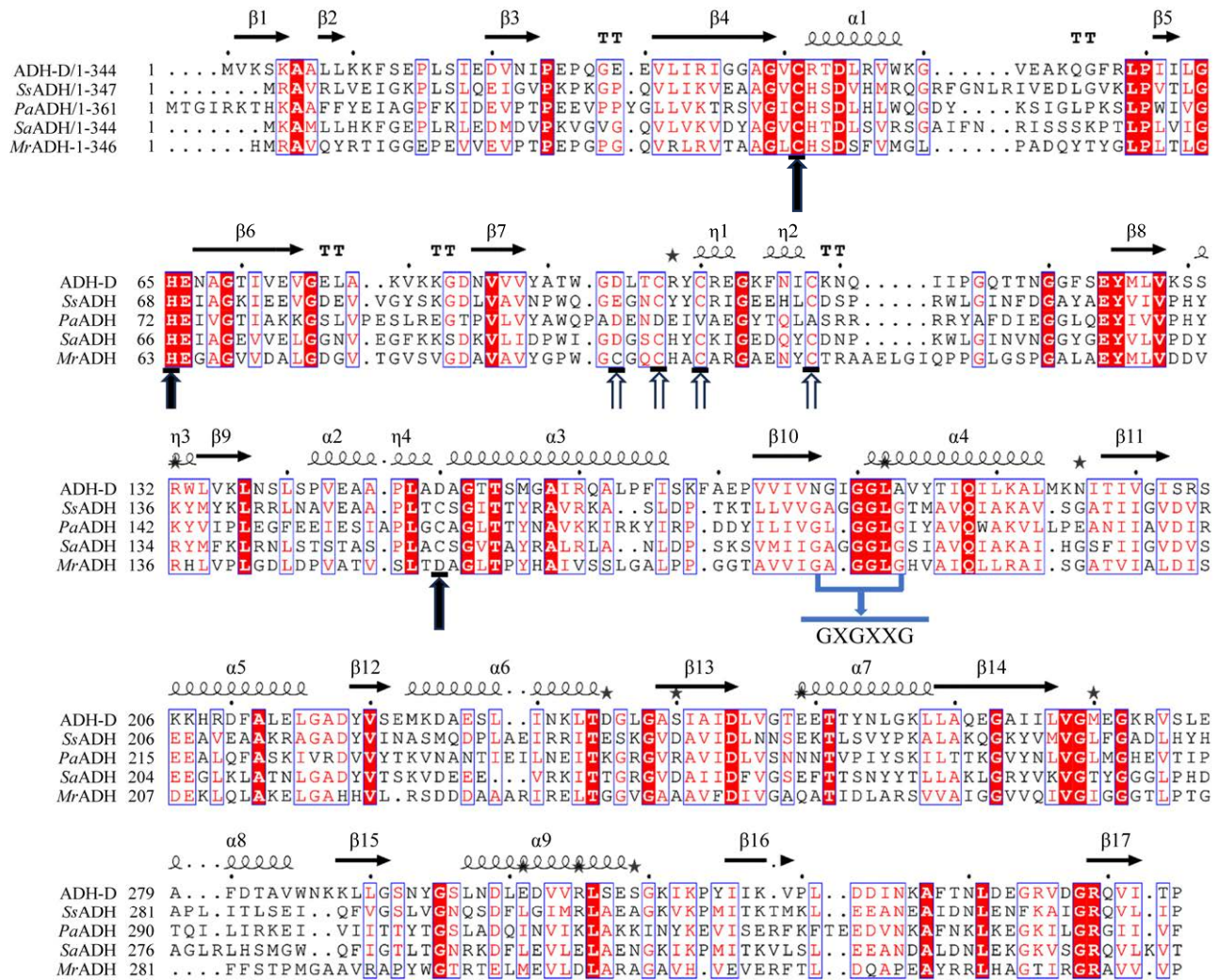


图 2 *MrADH* 与来源于中链醇脱氢酶超家族的氨基酸序列对比

Figure 2 Alignment of the amino acid sequences of *MrADH* with proteins derived from the medium-chain dehydrogenase superfamily. ADH-D: *Saccharolobus solfataricus* P2, PDB: 2H6E\_A; SsADH: *Saccharolobus solfataricus*, PDB: 1R37\_A; PaADH: *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2, PDB: NP\_559727; SaADH: *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639, PDB: Q4J781.1; *MrADH*: *M. roseus*.

和 107)。综合分析, *MrADH* 与已知酮还原酶 *RrADH* 的蛋白质序列一致性为 60.74%, 而目前尚无关于 *MrADH* 催化功能的研究报道, 所以 *MrADH* 可被视为 MDRs 超家族中的新成员。

### 2.3 *MrADH* 的纯化

为了深入研究 *MrADH* 的功能特性, 本研究通过镍柱亲和层析、脱盐及浓缩获得了浓度为 4.8 mg/mL 的纯酶, 并对 *MrADH* 纯酶进行

了 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3 所示。从图 3 中可以观察到, *MrADH* 在 40 kDa 附近有明显的蛋白条带, 与理论值 38.3 kDa 相符, 并且纯酶具有较高的纯度。进一步的功能分析表明, *MrADH* 展现出对辅因子的严格依赖性。本研究分别考察了 *MrADH* 对氧化型辅酶  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADP}^+$  及还原型辅酶的偏好性, 发现以  $\text{NADP}^+$  和  $\text{NADPH}$  为辅酶时, 未检测到 *MrADH* 对异

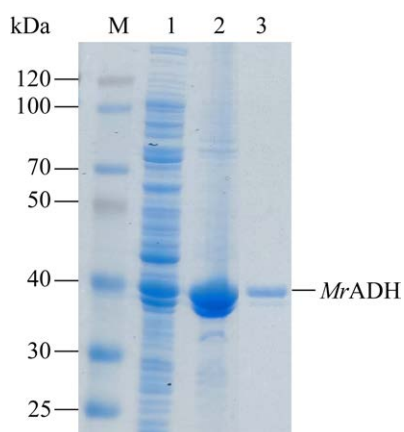


图3 纯化 *MrADH* 的 SDS-PAGE 图谱 M: 蛋白质 Marker; 1: 破碎上清; 2: 破碎沉淀; 3: *MrADH* 纯酶

Figure 3 SDS-PAGE analysis of purified *MrADH*. M: Protein marker; 1: Supernatant; 2: Precipitant; 3: Purified *MrADH*.

丙醇的氧化活力和对苯乙酮的还原活力, 而仅以  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$  为辅酶时 *MrADH* 才表现出氧化比活力和还原比活力, 分别为 3.8 U/mg 和 8.4 U/mg。

#### 2.4 pH 对 *MrADH* 氧化还原催化活性的影响

如图 4A 所示, *MrADH* 的最适还原 pH 值

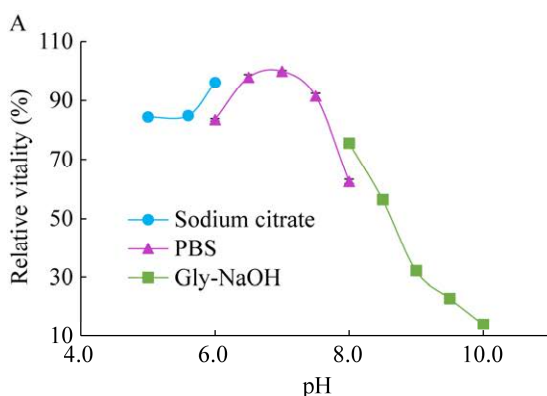


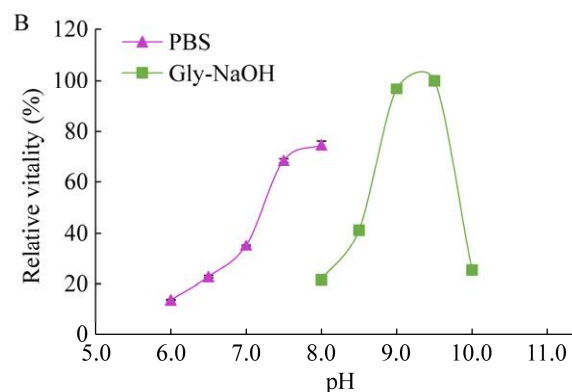
图4 pH 对 *MrADH* 活力的影响 A: pH 对 *MrADH* 还原活力的影响. B: pH 对 *MrADH* 氧化活力的影响

Figure 4 Effect of pH on the activity of *MrADH*. A: Effect of pH on the reducing activity of *MrADH*. B: Effect of pH on the oxidative activity of *MrADH*.

为 PBS 7.0, 在 pH 为 5.0–6.0 时, 还原活力上升, 且在 pH 6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中的还原活力大于 pH 6.0 的 PBS 缓冲液的还原活力。在 pH 6.0–8.0 的 PBS 中, 还原活力逐渐上升, 达到最大值, 而又迅速下降到 62.0%。在 pH 8.0–10.0 的 Gly-NaOH 中, 还原活力由 76.0% 骤降到 14.0%。对于其氧化活力, 其氧化最适 pH 值为 9.5, 在 pH 6.0–8.0 的 PBS 中, 氧化活力逐渐提高, 最高相对活力为 74.7%, 在 pH 8.0–10.0 的 Gly-NaOH 中, 氧化活力缓慢提高, 当 pH 值为 9.0–9.5 时, 活力迅速提高, 达到最大值, 然后在 pH 10.0 时相对活力骤降到 25.3% (图 4B)。此外, 在还原活力的最适 pH 下, 氧化活力仅为 35.2%, 在氧化最适 pH 下还原活力仅为 23.0%。这些结果表明, *MrADH* 的氧化还原活力受 pH 值影响显著。因此, 在实际的生物催化应用中, 需要针对特定的反应类型选择适合的 pH 条件, 以便最大限度地发挥 *MrADH* 的应用潜力。

#### 2.5 *MrADH* 的温度稳定性

如图 5A 所示, 在 30、40、50 和 60 °C 的





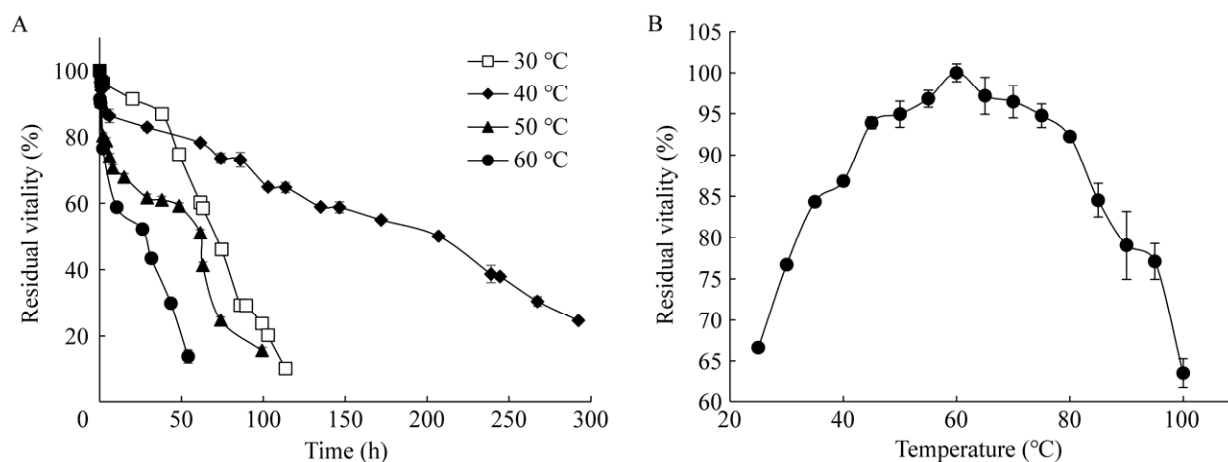


图5 温度对 *MrADH* 活力的影响 A: *MrADH* 在 30、40、50、60 °C 的半衰期. B: *MrADH* 的最适温度

Figure 5 Effect of temperature on the activity of *MrADH*. A: Half-life of *MrADH* at 30, 40, 50 and 60 °C. B: The optimal temperature of *MrADH*.

半衰期分别为 74.5、207.0、61.5 和 31.5 h, 经过实验测定 *MrADH* 的最适温度为 60 °C (图 5B),  $T_{50}^{15}$  为 70 °C。由此可见, *MrADH* 有良好的温度稳定性, 尤其是在 40 °C 下具备较长的半衰期。

## 2.6 金属离子及 EDTA 对 *MrADH* 活力的影响

金属离子在 *MrADH* 的功能和活性中发挥着至关重要的作用, 这些离子不仅直接参与催化反应, 还负责维持酶的结构稳定性、调节酶活性、并影响辅酶的结合与释放。为了深入了解金属离子对 *MrADH* 的具体影响, 考察了多种金属离子及乙二胺四乙酸(EDTA)对酮还原酶的作用。以不加金属离子时测得的酶活力为基准(设定为 100%), 结果见表 2。从表 2 中可以看出, 大多数金属离子对 *MrADH* 具有激活作用。其中,  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对酶活力的提升效果最为显著, 分别为对照的 1.55、1.42 和 1.30 倍。 $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  对酶活有轻微的抑制作用。另外,  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  这两种金属离子会导致酶完全失活。此外, 金属离子螯合剂 EDTA 也被发现能够抑制

表 2 不同金属离子及 EDTA 对 *MrADH* 的影响  
Table 2 Effects of different metal ions and EDTA on *MrADH*

金属离子及 EDTA	相对活力 Relative activity	金属离子及 EDTA	相对活力 Relative activity
$\text{Mg}^{2+}$	1.10	$\text{Co}^{2+}$	1.55
$\text{K}^{+}$	1.09	$\text{Ni}^{2+}$	0.92
$\text{Ca}^{2+}$	1.08	EDTA	0.76
$\text{Zn}^{2+}$	1.30	$\text{Al}^{3+}$	0.68
$\text{Mn}^{2+}$	1.06	$\text{Fe}^{3+}$	0.00
$\text{Ba}^{2+}$	1.11	$\text{Cu}^{2+}$	0.00
$\text{Na}^{+}$	1.42	Control	1.00

酶活。这一发现进一步证实了 *MrADH* 的金属离子依赖性, EDTA 通过与金属离子结合削弱了其对酶的正面作用。这一发现对于理解 *MrADH* 的催化机制及构建 *MrADH* 的高效不对称还原体系具有重要意义。

## 2.7 有机溶剂对酶活力的影响

潜手性酮大多具有疏水性, 这导致它们难以溶解于水溶液中。为了促进生物反应中的底物溶解并提高酶与底物的接触机会, 通常需要

加入有机助溶剂。有机助溶剂的使用不仅增加了底物的溶解量，还优化了传质效果，从而促进了生物反应的高效进行。因此本研究研究了一些有机溶剂对 *MrADH* 的影响。观察 50% 的有机溶剂在 2 h 内对酶活的影响，以不加有机溶剂做空白对照，设定为 100%，具体结果见图 6。从图 6 中可以看出饱和烃类有机溶剂对酶活的影响不大，在 2 h 后仍然保持为 75.9%–90.0% 的残余活力，其中正壬烷对 *MrADH* 的影响最小，残余活力为 90.0%，其余与水不溶性有机溶剂也有着 55.0%–65.0% 的残余活力，与水混溶的乳酸乙酯和二甲基亚砜(DMSO)对酶活力的影响较大，而乳酸乙酯使酶彻底失活。

## 2.8 *MrADH* 的底物特异性

为了深入探究 *MrADH* 在不对称还原各种潜手性酮以合成手性砌块醇方面的能力，本研究对其底物特异性进行了详细考察。在此过程

中，选择了一系列多样化的底物，涵盖烷基酮、酮酯、芳香酮、杂环酮、芳香杂环酮及双芳基酮等多种类型，同时还包括一些醇类。通过表 3 的数据分析，发现 *MrADH* 对酮类底物展现出广泛的活性，具体表现为对烷基单酮、烷基二酮和酮酯均具有一定的催化能力。另外，*MrADH* 对酮酯的催化活性高于烷基酮，而烷基二酮的活性也显著优于烷基单酮。以丙酮酸乙酯为例，其比活力为 31.30 U/mg。在芳香酮的还原方面，*MrADH* 能有效还原苯乙酮，并且对于间位取代基的活性大于对位取代基，但对邻位取代基的芳香酮则无活性。此外，*MrADH* 还展现了对杂环酮、芳香杂环酮和稠酮等体积较大、位阻较高的酮类物质的还原能力，其对 NEB-7S 的还原比活力为 3.60 U/mg。然而，对于 2,4-二氯苯甲酮等双芳基酮，*MrADH* 则无活性。在氧化底物谱方面，*MrADH* 更倾向于氧化仲醇，对仲丁醇

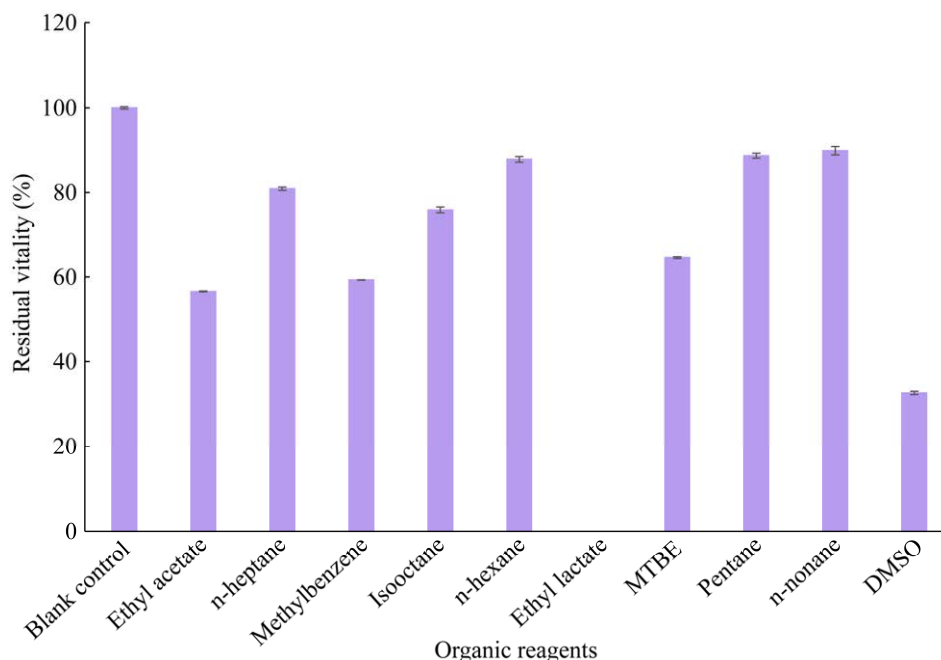


图 6 有机溶剂对 *MrADH* 活力的影响 MTBE: 甲基叔丁基醚; DMSO: 二甲基亚砜

Figure 6 Effect of organic solvents on *MrADH* activity. MTBE: Methyl tert-butyl ether; DMSO: Dimethyl sulfoxide.

表3 *MrADH* 氧化还原底物谱Table 3 *MrADH* redox substrate spectrum

还原底物 Reduced substrate	还原活力 Reduced specific activity (U/mg)	氧化底物 Oxidized substrates	氧化活力 Oxidized specific activity (U/mg)
丙酮 Acetone	1.50±0.03	异丙醇 Isopropanol	3.80±0.30
2-丁酮 2-butanone	4.90±0.08	正丁醇 1-butanol	0.10±0.02
4-甲基-2-戊酮 4-methyl-2-pentanone	6.10±0.40	仲丁醇 Sec-butyl alcohol	8.30±0.60
2,3-戊二酮 2,3-pentanedione	21.50±0.90	3-戊醇 3-pentanol	0.30±0.04
丙酮酸乙酯 Ethyl pyruvate	31.30±2.30	1-辛醇 1-octanol	0.70±0.03
4-氯乙酰乙酸乙酯 Ethyl 4-chloroacetoacetate	19.80±0.70	1,3-丁二醇 1,3-butanediol	0.50±0.01
苯乙酮 Acetophenone	8.40±0.50	1,5-戊二醇 1,5-pentanediol	0.20±0.02
2-羟基苯乙酮 2-hydroxy acetophenone	0.00±0.00	2,4-戊二醇 2,4-pentanediol	0.70±0.03
3-羟基苯乙酮 3-hydroxy acetophenone	5.20±0.50	1,2-己二醇 1,2-hexanediol	2.00±0.20
4-羟基苯乙酮 4-hydroxy acetophenone	2.50±0.30	环己醇 Cyclohexanol	0.30±0.04
间氯苯乙酮 m-chloroacetophenone	34.50±3.10		
对氯苯乙酮 4'-chloroacetophenone	32.10±2.70		
1-叔丁基-4-哌啶酮 1-tert-butyl-4-piperidone	24.50±2.40		
<i>N</i> -叔丁氧基哌啶酮 1-tert-butoxycarbonyl-2-piperidone	21.70±3.90		
NEB-7S	3.60±0.30		
2,4-二氯苯甲酮 2,4-dichlorobenzophenone	0.00		

的氧化比活力最高, 达 8.30 U/mg, 对异丙醇的比活力为 3.80 U/mg。上述结果表明 *MrADH* 具有广泛氧化还原底物谱, 在合成多种光学手性醇方面具有较高的应用潜力。

### 2.9 利用 *MrADH* 不对称还原合成 NEB-8(*R,S*)

为了研究 *MrADH* 在制备芳香杂环醇中的效果, 在 10 mL 体系中, 利用重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*mradh* 全细胞对 200 mmol/L (45.7 g/L) 的 NEB-7S 进行不对称还原, 反应进程如图 7。 *MrADH* 在 4 h 内完全催化了 NEB-7S 的不对称还原, 并保持着接近 100% *e.e.*。鉴于其高效的催化效率, 保持 S/C 不变, 进一步评估了其在 300 mmol/L (68.5 g/L) NEB-7S 下的性能。在 12 h 内 *MrADH* 的转化率超过了 99.0%, *e.e.* 仍然保持不变, 维持着较高的对映选择性。作为一种具有工业应用意义的催化剂, 应具备较高的底物耐受性 ( $\geq 100$  g/L)、优秀的催

化效率 ( $\leq 5$  g/L 酶用量)、较短的反应时间 ( $\leq 24$  h)、良好的转化率 ( $\geq 98\%$  的转化率) 和极佳的对映选择性 ( $\geq 99\%$  *e.e.*)。因此, 进一步在 600 mmol/L (137 g/L) NEB-7S 条件下评估了 *MrADH* 的应用潜力。在前 4 h 内, 转化率迅速增加, 最终在 24 h 内, *MrADH* 完成了将 600 mmol/L NEB-7S 还原为 NEB-8(*R,S*) 的反应, 转化率为 99.7%, *e.e.*  $> 99.9\%$ 。相较于其他 ADH, *MrADH* 在高底物负载下表现出稳定的催化性能。 *MrADH* 具有较高的 S/C 为 45.7 g/g。 *MrADH* 在奈必洛尔关键手性中间体的不对称合成中具有较好的应用开发潜力。

## 3 讨论与结论

本研究采用基因组数据挖掘策略从 *M. roseus* 中发现了具有芳香杂环酮还原活性的酮还原酶 *MrADH*, 并在大肠杆菌中成功可溶性表达。序

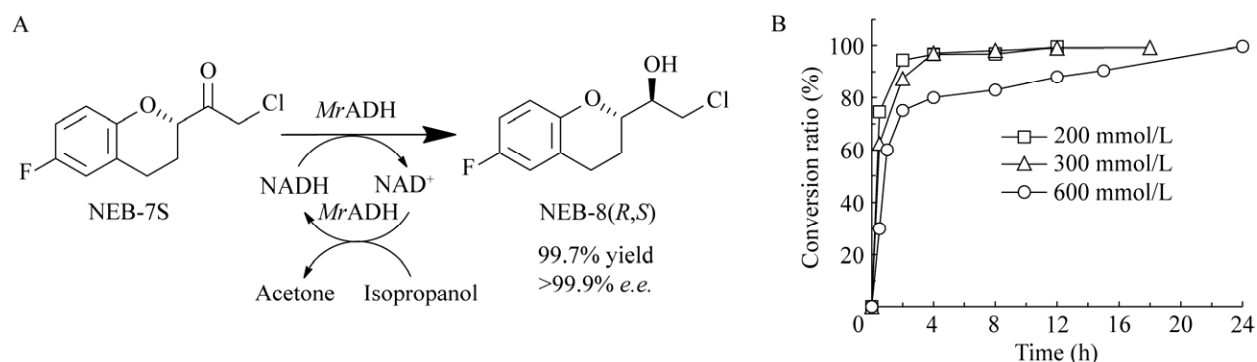


图7 *MrADH* 不对称还原 NEB-7S A: NEB-7S 不对称还原为 NEB-8(*R,S*). B: *MrADH* 不对称还原反应进程, 不同的标记代表不同的底物浓度

Figure 7 Asymmetric reduction of NEB-7S by *MrADH*. A: NEB-7S asymmetrically reduced to NEB-8(*R,S*). B: the process of *MrADH* asymmetric reduction, with different labels representing different substrate concentrations.

列分析显示 *MrADH* 属于中链醇脱氢酶超家族, 与其他 MDRs 相同, 具有保守的辅酶结合域以及锌离子配位残基。对 *MrADH* 进行了纯化和表征, 发现其具有严格的 NAD(H)依赖性, 兼具氧化和还原活力, 对苯乙酮和异丙醇的比活力分别为 8.40 U/mg 和 3.80 U/mg, 表明其具有底物偶联型辅酶再生的能力。酶学性质表征发现 *MrADH* 的还原活力和氧化活力的最适 pH 值分别为 7.0 和 9.5, 在 40 °C 的半衰期长达 207.0 h, 显示出良好的热稳定性。金属离子  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Na}^+$  等可以显著提高其催化活力。有机溶剂耐受性表明 *MrADH* 具有较高的有机溶剂耐受性, 可适用于疏水性非天然底物的不对称还原, 有助于实现高浓度底物负载的转化反应。底物谱分析表明 *MrADH* 对丙酮酸乙酯、N-叔丁氧基哌啶酮等底物具有较高还原活性, 但其对邻位取代酮的活力较低, *MrADH* 对异丙醇和仲丁醇等仲醇底物表现出较高氧化活性。*MrADH* 能够高效地催化还原 NEB-7S, 在 24 h 内可以 99.7% 的转化率和 >99.9% 的 *e.e.* 将 600 mmol/L (137 g/L) NEB-7S 还原为 NEB-8(*R,S*), S/C 为 45.7 g/g, 显著高于目前报道的最高水平, 表明 *MrADH*

在不对称还原 NEB-7S 具有较为显著的优势。本研究不仅为不对称合成盐酸奈必洛尔提供了重要的酶资源, 也为将来将其应用于其他对映异构体手性醇的合成奠定了坚实的基础。未来也将继续开展对 *MrADH* 的分子改造工作, 以进一步提升其催化性能, 拓宽其应用范围。

## REFERENCES

- [1] FICI F, ROBLES NR, TENGIZ I, GRASSI G. Beta-blockers and hypertension: some questions and answers[J]. High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention, 2023, 30(3): 191-198.
- [2] HUCK DM, ROSENBERG MA, STAUFFER BL. Nebivolol and incident cardiovascular events in hypertensive patients compared with nonvasodilatory beta blockers[J]. Journal of Hypertension, 2022, 40(5): 1019-1029.
- [3] WIKANANDA IF, NURCAHYA IM, WIJAYA PGPM, WIDIANA IR, SINDHUGHOSA DA. Effects of Nebivolol therapy on hemodynamic parameters and lipid profile compared to other beta blockers in patients with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis[J]. Caspian Journal of Internal Medicine, 2024, 15(1): 28-37.
- [4] BARTOLI S, MANNUCCI S, GRISELLI A, STEFANINI A. A process for the preparation of nebivolol hydrochloride[P]: American, WO2017125900.

- 2017-07-27.
- [5] 王福军, 程祖福, 刘玉坤, 杨泽心, 陈恬, 蒲通, 王家洪, 钟惺, 周映. 一种(S)-2-氯-1-(6-氟-1-苯并二氢吡喃-2-基)-乙醇的制备方法[P]: 中国, CN108314670A. 2018-07-24.
- [6] JAS G, FREIFELD I, KESSELER K. Procedure for the production of neбиволol[P]: American, DE102010005953. 2011-07-28.
- [7] 蒲通, 陈恬, 王乃星, 王福军, 王家洪, 宋庆宝, 谷绪顶, 张飞飞, 吕耀康. 一种奈必洛尔中间体的酶还原制备方法[P]: 中国, CN108913729A. 2018-11-30.
- [8] 唐铭烜, 许国超, 倪晔. 双芳基酮还原酶的基因挖掘及催化性质[J]. 食品科学与技术学报, 2018, 37(3): 240-249.
- TANG MH, XU GC, 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 (in Chinese).
- [9] 罗添玮. 奎宁酮还原酶的发掘和分子催化机制的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
- LUO TW. Discovery and study of the molecular catalytic mechanism of quinone reductase[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2022.
- [10] INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Gene, 1990, 96(1): 23-28.
- [11] YAMAMOTO H, MATSUYAMA A, KOBAYASHI Y, KAWADA N. Purification and characterization of (S)-1,3-butanediol dehydrogenase from *Candida parapsilosis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(9): 1769-1770.
- [12] de GONZALO G, LAVANDERA I, FABER K, KROUTIL W. Enzymatic reduction of ketones in "micro-aqueous" media catalyzed by ADH-A from *Rhodococcus ruber*[J]. Organic Letters, 2007, 9(11): 2163-2166.
- [13] KOSJEK B, STAMPFER W, POGOREVC M, GOESSLER W, FABER K, KROUTIL W. Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86(1): 55-62.
- [14] STAMPFER W, KOSJEK B, MOITZI C, KROUTIL W, FABER K. Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer[J]. Angewandte Chemie (International Edition in English), 2002, 41(6): 1014-1017.
- [15] ENUGALA TR, MORATÓ MC, KAMERLIN SCL, WIDERSTEN M. The role of substrate-coenzyme crosstalk in determining turnover rates in *Rhodococcus ruber* alcohol dehydrogenase[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(16): 9115-9128.
- [16] MAURER D, ENUGALA TR, HAMNEVIK E, BAUER P, LÜKING M, PETROVIĆ D, HILLIER H, KAMERLIN SCL, DOBRITZSCH D, WIDERSTEN M. Stereo- and regioselectivity in catalyzed transformation of a 1,2-disubstituted vicinal diol and the corresponding diketone by wild type and laboratory evolved alcohol dehydrogenases[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(8): 7526-7538.
- [17] ARNOLD FH. Engineering enzymes for non-aqueous solvents[J]. Trends in Biotechnology, 1990, 8(9): 244-249.
- [18] ARNOLD FH. Protein design for non-aqueous solvents[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1988, 2(1): 21-25.
- [19] KORKHIN Y, KALB AJ, PERETZ M, BOGIN O, BURSTEIN Y, FROLOW F. NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 278(5): 967-981.
- [20] KARABEC M, ŁYSKOWSKI A, TAUBER KC, STEINKELLNER G, KROUTIL W, GROGAN G, GRUBER K. Structural insights into substrate specificity and solvent tolerance in alcohol dehydrogenase ADH-'A' from *Rhodococcus ruber* DSM 44541[J]. Chemical Communications, 2010, 46(34): 6314-6316.