

精细化工中间体

固定化  $c$ - $\omega$ -转氨酶催化合成(4S)-四氢萘酮高嵩<sup>1</sup>, 邵小芙<sup>1</sup>, 果波<sup>1</sup>, 李前<sup>1</sup>, 王佩<sup>2</sup>, 曹阳<sup>1\*</sup>

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 南京师范大学 食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023)

**摘要:** 以 T4 噬菌体衣壳为载体, 探索了海绵假弧菌- $\omega$ -转氨酶 ( $P$ - $\omega$ -TA) 的自组装固定化, 以将  $P$ - $\omega$ -TA 与 T4 噬菌体非必需小外壳蛋白 (Soc) 融合的方式实现了  $P$ - $\omega$ -TA 在 T4 噬菌体衣壳上的亲和固定及较高的位点结合数。对固定化  $P$ - $\omega$ -TA 的适应性、回收性能、(S)-型异构体选择性拆分及(1S,4S)-去甲基舍曲林的催化能力进行了测试。结果表明, 固定化的  $P$ - $\omega$ -TA 保持了完整的活性及适应性, 可通过离心操作轻松地回收, 并进行重复使用。在 5 次回收和重复使用过程中, 每次酶活回收率均>91%, 经 5 次催化, 最终酶活保持率约为 84%。固定化  $P$ - $\omega$ -TA 保持了在底物手性中心处的(S)-型异构体选择性拆分以及对(1S,4S)-去甲基舍曲林的催化能力。

**关键词:** 海绵假弧菌- $\omega$ -转氨酶; T4 噬菌体; 手性拆分; 酶固定化; 舍曲林; 精细化工中间体

中图分类号: TQ463; Q814.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 05-1152-09

Synthesis of (4S)-tetrahydronaphthalone catalyzed by immobilized *Pseudovibrio*- $\omega$ -aminotransferaseGAO Song<sup>1</sup>, SHAO Xiaofu<sup>1</sup>, GUO Bo<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, WANG Pei<sup>2</sup>, CAO Yang<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China; 2. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu, China)

**Abstract:** The self-assembly immobilization of *Pseudovibrio*- $\omega$ -transaminase ( $P$ - $\omega$ -TA) was explored using bacteriophage T4 capsid as carrier. Fusion of  $P$ - $\omega$ -TA to the non-essential small outer capsid protein (Soc) of bacteriophage T4 led to the affinity immobilization of  $P$ - $\omega$ -TA on the T4 capsid with a high copy number. The adaptability, recovery performance, selective resolution of (S)-type isomers and the catalytic capacity of (1S,4S)-demethylsertraline were further evaluated. The results showed that the immobilized  $P$ - $\omega$ -TA retained its full activity and adaptability, with easy recovery through centrifugation for repeated uses. In a five-round recovery and re-use process, the recovery rate of enzyme activity was greater than 91% for each round. After five times of catalysis, the final enzyme activity retention rate was about 84%. The immobilized  $P$ - $\omega$ -TA maintained the (S)-type selective resolution at the chiral center of the substrate and the catalytic capacity of (1S,4S)-demethylsertraline.

**Key words:** *Pseudovibrio*- $\omega$ -transaminase; bacteriophage T4; chiral resolution; enzyme immobilization; sertraline; fine chemical intermediates

抑郁症已经成为全球最严重的医疗和公共卫生负担之一<sup>[1-2]</sup>。由辉瑞公司(美国康涅狄格州格罗顿)研发的舍曲林是抗抑郁症治疗的 5 种主要药物之一, 其为全球对抗抑郁症的努力提供了强有力的支

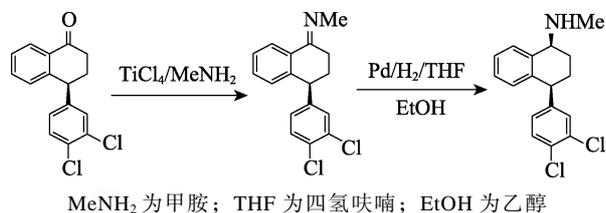
持<sup>[3]</sup>。作为一种选择性 5'-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)型抗抑郁药, 舍曲林结构中具有两个手性中心, 在普通化学路线中难以合成, 需通过不对称合成及异构体分离才能获得特定的异构体<sup>[4-5]</sup>。(4S)-

收稿日期: 2023-05-17; 定用日期: 2023-08-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230398

基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX2022-31)

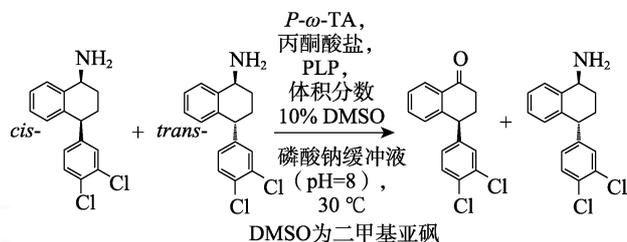
作者简介: 高嵩(1980—), 男, 教授, E-mail: gaos@jou.edu.cn。联系人: 曹阳(1990—), 男, 讲师, E-mail: 202000088@jou.edu.cn。

四氢萘酮是舍曲林合成中的关键中间体, 如果能准确地进行手性拆分, 那么可以通过简单、非立体选择性的步骤将(4S)-四氢萘酮转化为舍曲林, 反应式如下<sup>[4,6]</sup>:

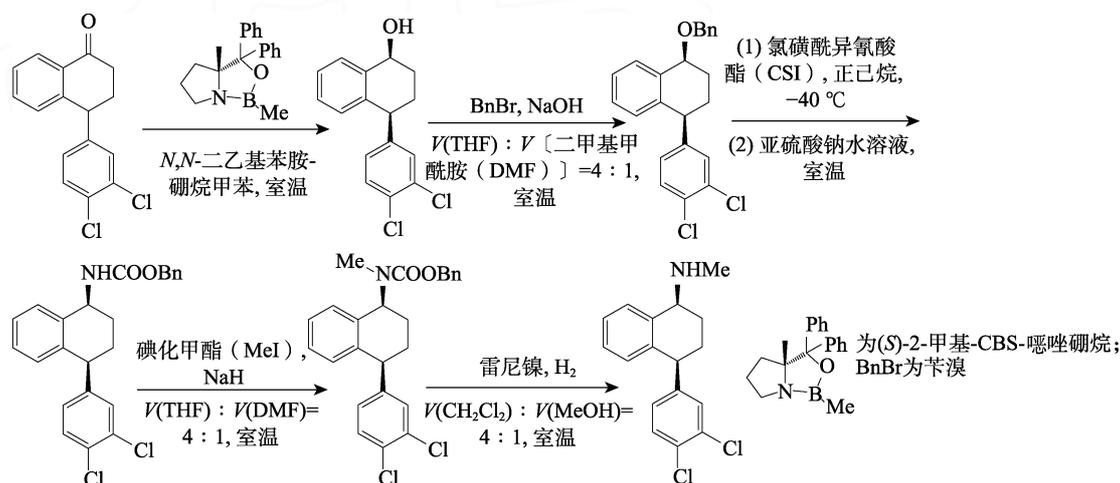


然而, 目前仍缺乏操作简单、环境友好的(4S)-四氢萘酮合成和手性拆分化学路线<sup>[6-8]</sup>。酶在生物催化中表现出天然的立体选择性, 并在绿色化学技术中提供立体化学解决方案<sup>[9]</sup>。海绵假弧菌- $\omega$ -转氨酶(*P*- $\omega$ -TA)是一种发现于海绵 *Pseudovibrio* sp. WM33 (GenPept accession No. WP\_063301853)、

依赖于吡哆醛-5'-磷酸盐 (PLP) 的转氨酶, 通过底物远端手性中心的(*S*)-型异构体选择性, 表现出良好的可将(1*S*,4*S*)-去甲基舍曲林进行手性拆分转化为(4*S*)-四氢萘酮的性能, 反应式如下<sup>[8]</sup>:



基于该酶的手性拆分作用可以显著简化舍曲林的合成, *P*- $\omega$ -TA 在这种重要抗抑郁药物的合成中具有良好的应用潜力<sup>[6-8]</sup>。典型的舍曲林合成路线反应式如下<sup>[5]</sup>:



酶的生物催化应用往往受制于高成本, 这是由酶的制备复杂、一次性使用和不稳定性所引起的。这个问题可以通过酶固定化来解决。通过酶的固定化, 酶的稳定性通常会增加, 并且酶的回收和重复使用也更方便<sup>[10]</sup>。T4 噬菌体衣壳是一个 80 nm×110 nm 的长二十面体蛋白质外壳, 由 930 个基因产物 23 (gp23 蛋白, 相对分子质量 49000, 以下简称分子量) 组成, 并装饰有 2 个非必需蛋白: 小外壳蛋白 (Soc, 分子量 9000, 每壳体 870 拷贝) 和高抗原性外壳蛋白 (Hoc, 分子量 39000, 每壳体 155 拷贝)<sup>[11-12]</sup>, 可以作为理想的酶固定化载体。作为一种纳米级颗粒, T4 噬菌体衣壳具有天然的大比表面积, 可有效进行酶固定化<sup>[13]</sup>, 且相较于以往的纳米级材料, T4 噬菌体衣壳基于其天然生物材料的性质, 材料颗粒均匀, 且经改造后的酶可基于自组装的方式实现定向固定, 无需复杂的载体活化操作,

并且可减少由于蛋白空间构象改变造成的活性损失。当将酶以适当的方式改造成 Soc 或 Hoc 的融合蛋白时, 2 个非必需蛋白数量众多的结合位点可用于酶的亲和固定化, 而亲和固定化有利于保留酶的活性。此外, T4 噬菌体衣壳的组装是一个精确的生物过程<sup>[14]</sup>, 这保证了均匀的颗粒大小和有序排列的酶固定化位点。T4 噬菌体衣壳作为疫苗输送载体的成功应用已经证明了外源蛋白在 T4 噬菌体衣壳体上的稳定组装和良好的活性持久性<sup>[15-17]</sup>。

本研究通过工程设计将 *P*- $\omega$ -TA 和 Soc 改造为融合蛋白实现了 *P*- $\omega$ -TA 在 T4 噬菌体衣壳上的高数量位点结合自组装固定化, 并对固定化后 *P*- $\omega$ -TA 的 pH 及温度适应性、固定化酶回收能力、选择能力与(1*S*,4*S*)-去甲基舍曲林的催化能力进行了测试。本研究可提高 *P*- $\omega$ -TA 的使用效率, 从而为舍曲林的生产降低成本。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

$\alpha$ -甲基苄胺、(S)- $\alpha$ -甲基苄胺、PLP、三乙胺、乙腈、磷酸二氢钠、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl)、NaCl、MgSO<sub>4</sub>、氯仿、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、DMSO, AR, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 丙酮酸钠、乙酰氯, AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 苯乙酮, AR, 河南郑州阿尔法化学有限公司; (1S,4S)-4-(3,4-二氯苯基)-1,2,3,4-四氢萘-1-胺盐酸盐, AR, 湖北黄石永信医药科技有限公司; 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、乙酸乙酯、二氯甲烷, AR, 上海毕得医药科技股份有限公司; DNase I (AR)、二乙基氨基乙基 (DEAE) 离子交换柱, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

10-amber 13-amber hoc-del soc-del T4 噬菌体突变体、大肠杆菌 P301 菌株, 美国华盛顿特区美国天主教大学 VENIGALLA B. RAO 博士实验室赠送。

Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 股份公司; JN-02C 低温超高压连续流破碎机, 广州聚能纳米生物科技股份有限公司; AKTA 蛋白纯化系统, 英国 GE Healthcare 公司; LC-20 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; T100 基因扩增仪, 伯乐生命医学产品有限公司。

### 1.2 酶的重组表达

将优化后的原核表达蛋白编码序列 (GenBank accession No. WP\_063301853) 插入 pET-28a(+) 载体的 T7 启动子下游, 原核重组表达 *P- $\omega$ -TA*, 重组质粒表达的 *P- $\omega$ -TA* 序列 N-端进行 his-标签标记。为了实现 Soc-*P- $\omega$ -TA* 的重组融合表达, 将 *soc* 基因 (GenBank accession No. NP\_049644.1) 插入上述构建的重组质粒 *P- $\omega$ -TA* 序列同一编码阅读框上游, 使 Soc 与 *P- $\omega$ -TA* 的 N-端融合。序列的准确性得到了验证。DNA 合成、分子克隆和测序由安徽合肥通用生物有限公司完成。*P- $\omega$ -TA* 在大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 菌株中通过异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷诱导过表达, Soc-*P- $\omega$ -TA* 在 BL21(DE3) pLysS 菌株中表达通过异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷诱导过表达, 并通过 AKTA Prime Plus 系统 (GE Healthcare Life Sciences, Boston, MA, USA) 实现镍基亲和层析纯化。纯化后的 *P- $\omega$ -TA* 保存在 pH 为 8 的 20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl 和体积分数为 10% 的甘油中。

### 1.3 (S)- $\alpha$ -甲基苄胺的脱氨反应

反应液共计 40 mL, 其中含有 10 mmol/L (S)- $\alpha$ -

甲基苄胺、10 mmol/L 丙酮酸钠、1 mmol/L PLP、3  $\mu$ mol/L 的酶、体积分数 10% 的 DMSO 和 50 mmol/L 的磷酸钠 (pH=8)。30 °C 下反应 1 h 后, 加入 20 mL 乙酸乙酯淬灭反应, 并以乙酸乙酯萃取 3 次 (20 mL $\times$ 3), 合并有机相, 并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 旋干溶剂得到粗产品。收率为 88%。<sup>1</sup>HNMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 7.98~7.92 (m, 2H, ArH), 7.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.46 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 2.60 (s, 3H, —CH<sub>3</sub>)。

酶活曲线反应体系同上, 体积共计 1 mL。30 °C 下反应 20 min 后, 加入乙酸乙酯 [V(反应液): V(乙酸乙酯)=1:1] 提取反应混合物, 取 100  $\mu$ L 乙酸乙酯相用乙腈稀释 3 倍, 经高效液相色谱仪检测。HPLC 外标法制作苯乙酮标准曲线, 定量计算苯乙酮的生成量。检测色谱条件: Agilent ZORBAX Extend-C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5  $\mu$ m), 流动相 V(乙腈): V(三乙胺水溶液, pH=10.3) = 28:72, 流速 0.8 mL/min, UV 检测器波长 245 nm, pH=10.3, 保留时间 (*R<sub>t</sub>*) = 11.1 min。经乙腈稀释后的样品过滤制样, 进样体积为 10  $\mu$ L, 检测时间为 20 min。

### 1.4 Soc 蛋白缺失的 T4 衣壳的制备

Soc 蛋白缺失的 T4 衣壳依据 TAO 等<sup>[18]</sup>报道方法, 使用 10-amber 13-amber hoc-del soc-del T4 噬菌体突变体感染大肠杆菌 P301(sup-) 细胞制备。将被 T4 噬菌体突变体感染的 500 mL 大肠杆菌细胞进行离心收集, 在 40 mL pH 为 7.5 的 26 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、68 mmol/L NaCl、22 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 溶液中裂解, 溶液中包含质量浓度 10 mg/L DNase I 和 2 mL 氯仿。裂解液 37 °C 孵育 1 h, 分别以 6000 r/min 离心 10 min 和 15000 r/min 离心 45 min 进行 2 次离心, 最终沉淀中的 T4 衣壳悬浮在 200  $\mu$ L pH 为 7.5 的 10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl 和 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液中, DEAE 离子交换层析进一步纯化。制备的 Soc 蛋白缺失的 T4 衣壳采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 定量分析。

### 1.5 酶固定化

将 Soc-*P- $\omega$ -TA* 融合酶与 Soc 蛋白缺失的 T4 衣壳在 pH 为 7.5 的 10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl 及 5 mmol/L 200  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 缓冲液中 16 °C 孵育 1 h。将衣壳颗粒在 15000 r/min 下离心 70 min, 并用上述相同的缓冲液洗涤两次去除未结合的酶。酶固定衣壳颗粒在小体积缓冲液中以离心机涡旋重悬, 并通过 SDS-PAGE 进行定量分析。通过在 SDS-PAGE 凝胶上量化融合酶 (分子量 62150) 对

应的条带强度来计算固定酶在衣壳上的结合数, 并与 gp23 (分子量 49000, 每衣壳 930 拷贝) 在同一通道上的条带强度进行比较。将融合酶的条带强度转换为融合酶结合数的计算依据 gp23 的分子量和位点数进行。

### 1.6 固定化酶适应性及比活力测试

固定化 *P*- $\omega$ -TA 的适应性及比活力测试以天然 *P*- $\omega$ -TA 为参照, 固定化及天然 *P*- $\omega$ -TA 的测试质量为 39  $\mu$ g, 温度适应性测试选取 20、30、40、50、60  $^{\circ}$ C 共 5 组温度, pH 为 8; pH 适应性测试选取 6、7、8、9、10、11、12 共 7 组梯度, 温度为 30  $^{\circ}$ C, 测试及检测体系同(*S*)- $\alpha$ -甲基苄胺的脱氨反应测试。将 30  $^{\circ}$ C 下 1 min 内将底物转化为 1 nmol 苯乙酮所需酶量定义为 1 U。将每 mg 酶含有的酶活性单位数定义为比活力 U/mg。相对比活力定义为某温度下测得的比活力与一系列不同温度下测得的最高比活力的比率。

### 1.7 固定化 *P*- $\omega$ -TA 的回收

脱氨反应结束后, 反应混合物中固定的 *P*- $\omega$ -TA 在 4  $^{\circ}$ C 下, 15000 r/min 离心 70 min 回收。用 pH 为 8 的 20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl 1 mL 缓冲液对离心沉淀进行 2 次洗涤, 去除残留的反应组分。将沉淀中回收的酶重悬在上述缓冲液中进行下一次脱氨反应。产物为苯乙酮的固定化 *P*- $\omega$ -TA 的回收测试体系及测试方法同(*S*)- $\alpha$ -甲基苄胺的脱氨反应。将酶回收后进行下一次反应测得的酶活与上一次反应总酶活的比率定义为酶活回收率。将酶回收后进行下一次反应测得的酶活与上一次反应总酶活扣除噬菌体衣壳离心回收造成的酶损失后的理论保持酶活的比率定义为酶活保持率。

### 1.8 (4*S*)-四氢萘酮目标产物酶活回收

目标产物为(4*S*)-四氢萘酮的脱氨反应酶活回收测试中(1*S*,4*S*)-去甲基舍曲林底物浓度为 1 mmol/L, 反应总体积为 7 mL, 反应其他物质及浓度与苯乙酮目标产物的酶活回收测试体系保持一致。反应后体系回收方式同苯乙酮目标产物酶活回收。离心上层反应液以乙酸乙酯萃取 3 次(7 mL $\times$ 3), 萃取有机相旋干后通过  $^1$ HNMR 确定 3 次反应酶活回收比例, 每组反应体系加入 0.5  $\mu$ L 苯乙酮作为内标物, 计算每组反应生成产物的单一氢特征峰面积与苯乙酮单一氢特征峰面积的比值, 将每组第 2 次及第 3 次反应产物与苯乙酮的比例与第 1 次反应进行比较, 换算出的百分比即为酶活回收比例。

### 1.9 (*S*)-型异构体选择性验证

以外消旋  $\alpha$ -甲基苄胺为底物进行转氨反应, 30  $^{\circ}$ C 下反应 1 h 后, 以乙酸乙酯萃取 3 次(30 mL $\times$ 3), 合并有机相, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 旋干溶剂得残留物; 残留物用 30 mL 二氯甲烷溶解, 依次加入乙酰氯 229  $\mu$ L (253 mg)、三乙胺 460  $\mu$ L (335 mg), 薄层色谱法(TLC)跟踪[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=1:3]反应; 反应以水淬灭, 二氯甲烷萃取 3 次(10 mL $\times$ 3), 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 旋干溶剂, 柱层析[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=1:3]纯化, 得到 *N*-(1-苄乙基)乙酰胺。用正己烷溶解纯化后的产品, 通过 HPLC 检测, 进样量为 10  $\mu$ L, 检测时间为 20 min。对映体过量值为 94%。HPLC 检测条件: 大赛璐 Chiracel AD-H(10 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu$ m), V(正己烷): V(异丙醇)=90:10, 1 mL/min, 检测温度 30  $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm, (*R*)-型  $R_t$ =9.8 min, (*S*)-型  $R_t$ =12.4 min。

### 1.10 (4*S*)-四氢萘酮制备活性验证

以 1.93  $\mu$ mol/L 固定 *P*- $\omega$ -TA 和 1 mmol/L (1*S*,4*S*)-4-(3,4-二氯苯基)-1,2,3,4-四氢萘-1-胺盐酸盐为底物进行 30 mL 的脱氨反应。在 30  $^{\circ}$ C 下反应 1 h, 反应结束后以乙酸乙酯萃取产物。粗产品经柱层析[V(石油醚): V(乙酸乙酯)=1:3]纯化, 纯化后旋蒸除溶剂得到产品。以正己烷溶解纯化后的产品, 通过 HPLC 检测, 进样量为 10  $\mu$ L, 检测时间为 15 min。HPLC 测定条件: 大赛璐 Chiracel OJ-H(4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5  $\mu$ m), V(正己烷): V(异丙醇)=80:20, 1 mL/min, 245 nm, (4*R*)-型  $R_t$ =7.93 min, (4*S*)-型  $R_t$ =8.65 min。以 CDCl<sub>3</sub> 溶解产品, 经  $^1$ HNMR、 $^{13}$ CNMR、HRMS 验证产品结构。收率为 73.5%。 $^1$ HNMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 8.09 (dd,  $J$  = 7.8、1.5 Hz, 1H, ArH), 7.44 (td,  $J$  = 7.5、1.6 Hz, 1H, ArH), 7.39~7.32 (m, 2H, ArH), 7.21 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.97~6.91 (m, 2H, ArH), 4.26 (dd,  $J$  = 8.2、4.6 Hz, 1H, —CH), 2.73~2.56 (m, 2H, —CH<sub>2</sub>), 2.49~2.39 (m, 1H, —CH<sub>2</sub>), 2.24 (dt,  $J$  = 13.4、9.3、4.5 Hz, 1H, —CH<sub>2</sub>);  $^{13}$ CNMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 196.96, 144.63, 143.85, 133.59, 132.52, 132.48, 130.69, 130.38, 130.30, 129.05, 127.76, 127.28, 127.12, 44.29, 36.30, 31.43。HRMS (ESI),  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup>理论值 291.0343; 测试值 291.0341。对映体过量值 > 99%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化 *P*- $\omega$ -TA 的回收及重复催化原理

固定化 *P*- $\omega$ -TA 可回收生物催化原理示意图见图 1。通过固定化 *P*- $\omega$ -TA 实现酶的回收及重复进行生物催化的原理是: 固定化 *P*- $\omega$ -TA 正常催化外消

旋胺底物的对映选择性脱氨，并在生物催化反应完成后，通过简单的离心步骤从反应混合物中回收该固定化酶（图 1a、b）。离心回收的步骤并不复杂，因为酶的固定化载体 T4 噬菌体衣壳是一种纳米颗粒，与催化反应混合物中的其他组分在沉降速度上有很大不同，易于通过差速离心分离<sup>[19]</sup>。回收的 *P-ω*-TA 被重复应用于生物催化反应（图 1c），而离心后的上清液中含有手性分离的产物酮，可以按照需要在后续的合成步骤中加工处理（图 1d）。

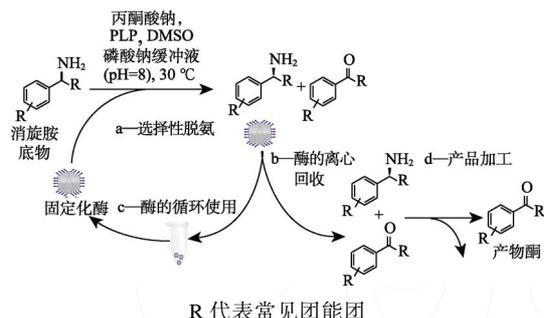
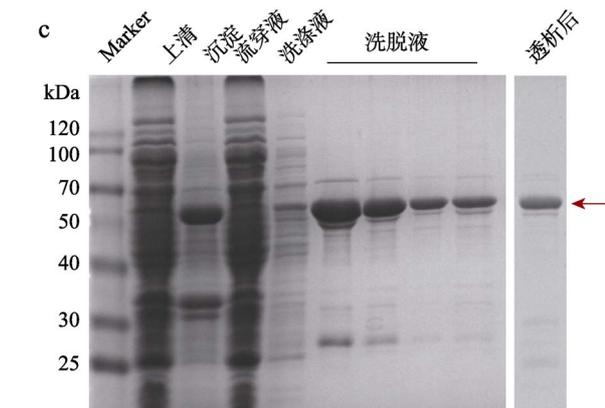
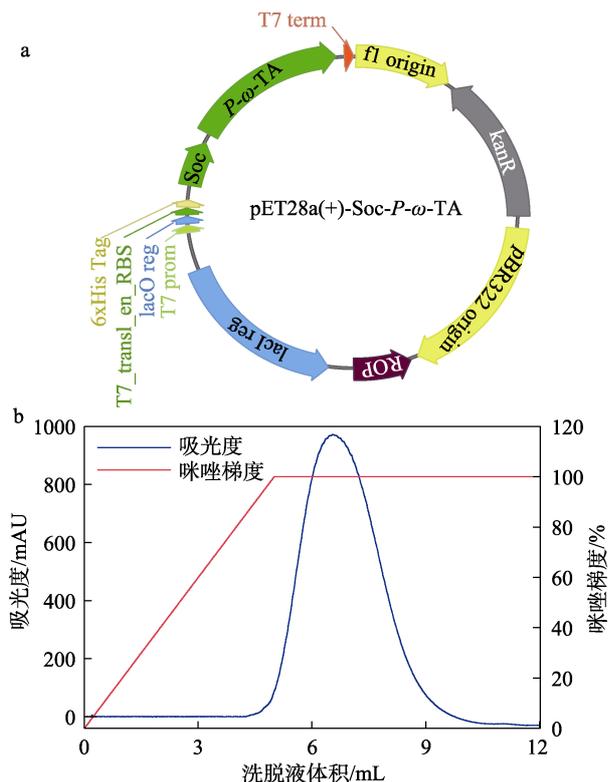


图 1 固定化 *P-ω*-TA 可回收生物催化原理示意图：固定化 *P-ω*-TA 催化脱氨反应 (a)；离心回收固定化酶 (b)；循环利用固定化酶 (c)；产品加工 (d)

Fig. 1 Schematic diagram of principle of recoverable biocatalysis by immobilized *P-ω*-TA: Immobilized *P-ω*-TA catalyzing deamination reaction (a); Centrifugal recovery of immobilized enzymes (b); Recycling of immobilized enzymes (c); Product processing (d)

## 2.2 Soc-*P-ω*-TA 融合酶的制备

Soc-*P-ω*-TA 融合酶的表达和活性见图 2。



6xHis Tag 为组氨酸纯化标签；T7\_transl\_en\_RBS 为核糖体结合位点；lacO reg 为乳糖操纵子调节因子；T7 prom 为 T7 启动子；Marker 为相对分子质量标准；将洗脱液中竞争性洗脱化合物咪唑 0~400 mmol/L 定义为咪唑梯度 0~100%，下同

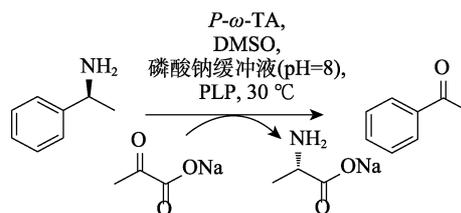
图 2 Soc-*P-ω*-TA 融合酶的表达和活性：表达 Soc-*P-ω*-TA 融合酶的重组质粒谱图 (a)；Soc-*P-ω*-TA 的镍基质亲和层析紫外吸收曲线 (b)；Soc-*P-ω*-TA 表达和纯化的 SDS-PAGE 凝胶验证图 (c)

Fig. 2 Expression and activity of Soc-*P-ω*-TA fusion enzyme: Recombinant plasmid map expressing Soc-*P-ω*-TA fusion enzyme (a); UV absorption curve of Soc-*P-ω*-TA by nickel matrix affinity chromatography (b); SDS-PAGE gel validation image of Soc-*P-ω*-TA expression and purification (c)

本研究中的酶固定化方法利用了 T4 噬菌体衣壳上的 Soc 结合位点。Soc 的高结合位点数（每个衣壳 870 结合位点）可以用于 *P-ω*-TA 的高密度固定化。通过 DNA 重组技术，将 Soc 与 *P-ω*-TA 的融合基因构建到 pET-28a(+)载体上，用于 N-末端带有 His 标签的 Soc-*P-ω*-TA 融合酶的重组表达（图 2a）。之所以将 Soc 融合到 *P-ω*-TA 的 N 端，是因为 C 端融合破坏了 *P-ω*-TA 酶的结构，使其变得不可溶。通过镍亲和层析技术制备了 Soc-*P-ω*-TA 融合酶，根据 SDS-PAGE 分析判断其纯度约为 95%（图 2b、c）。融合酶上的 Soc 可以通过 Soc 结合位点自组装到 Soc 蛋白缺失的 T4 衣壳上<sup>[20]</sup>。

## 2.3 Soc-*P-ω*-TA 融合酶的活性

为了确定 Soc-*P-ω*-TA 融合酶是否保留了完整的活性，使用脱氨反应定量测试了酶活，将 (*S*)- $\alpha$ -甲基苄胺转化为苯乙酮，反应式如下：



通过 <sup>1</sup>HNMR 和 HPLC 分析反应产物，确认了苯乙酮的生成（图 3a~b），并建立了反应产物苯乙酮与紫外吸收峰面积之间关系的标准曲线，用于

定量分析 (图 3c)。

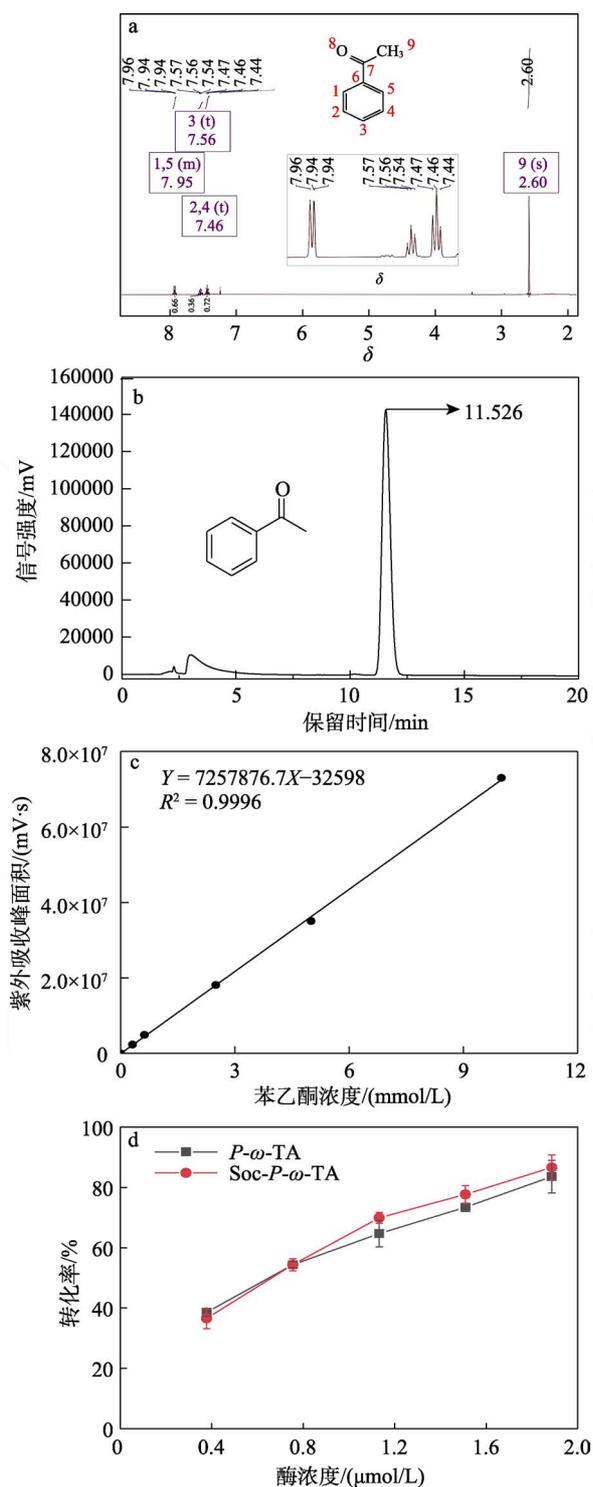


图 3 脱氨产物苯乙酮分析结果: 脱氨产物苯乙酮的  $^1\text{H NMR}$  谱图 (a); 脱氨产物苯乙酮保留时间 HPLC 谱图 (b); 苯乙酮浓度与紫外吸收峰面积标准曲线 (c);  $P-\omega\text{-TA}$  及  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  脱氨活性的定量曲线 (d)

Fig. 3 Analysis results of deamination product acetophenone: Analysis of  $^1\text{H NMR}$  spectrum (a); HPLC profile of deamination product acetophenone retention time (b); Standard curve of acetophenone concentration and UV absorption peak area (c); Quantitative curves of deamination activity of  $P-\omega\text{-TA}$  and  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  (d)

确定了不同浓度下  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  融合酶转化 (S)- $\alpha$ -甲基苄胺为苯乙酮的转化率, 并与天然酶进行了比较 (图 3d)。结果显示, 天然酶和融合酶之间没有较大差异, 表明  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  融合酶保留了完整的酶活。

## 2.4 $P-\omega\text{-TA}$ 在 T4 衣壳上的固定化

$\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  融合酶在溶液中与 Soc 蛋白缺失的 T4 衣壳结合的固定化反应是自发发生的。这个自组装过程基于融合酶的 Soc 结构域与 T4 衣壳上 Soc 结合位点之间的亲和结合。通过测定 Soc 结合位点与  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  融合酶的不同物质的量比 [ $n(\text{T4 衣壳}) : n(\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}) = 1 : 1 \sim 1 : 80$ ] 下融合酶的固定化效率, 建立了一个结合曲线, 结果见图 4。图 4 显示, T4 噬菌体衣壳上最多能固定的  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  融合酶为 668.5 结合位点, 解离常数为  $1.155 \mu\text{mol/L}$ , 表明  $\text{Soc-}P-\omega\text{-TA}$  融合酶可在 T4 噬菌体衣壳上实现高密度的固定化。

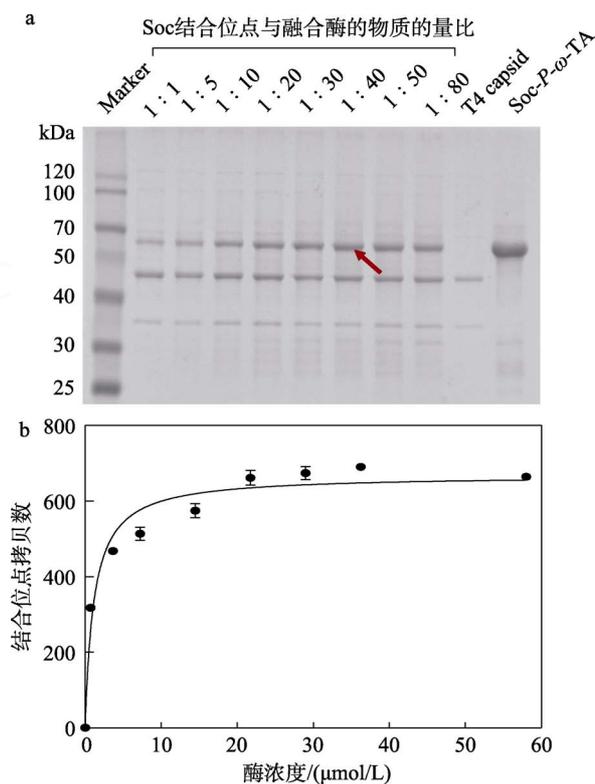


图 4  $P-\omega\text{-TA}$  的固定化结合比例及结合位点数量确定: SDS-PAGE 凝胶图像显示 T4 噬菌体衣壳上结合位点与不同比例的结合酶 (a); 量化结合非线性回归曲线 (b)

Fig. 4 Immobilized binding ratio of  $P-\omega\text{-TA}$  and determination of the number of binding sites: SDS-PAGE gel images showing the binding sites and different proportions of binding enzymes on bacteriophage T4 capsid (a); Quantized combined nonlinear regression curve (b)

根据结合曲线可知, 结合位点与融合酶的物质  
的量比为 1 : 40 时足以实现高效的酶固定化。

## 2.5 固定化 *P-ω*-TA 适应性及比活力测试

固定化 *P-ω*-TA 适应性及动力学测试结果见图 5。

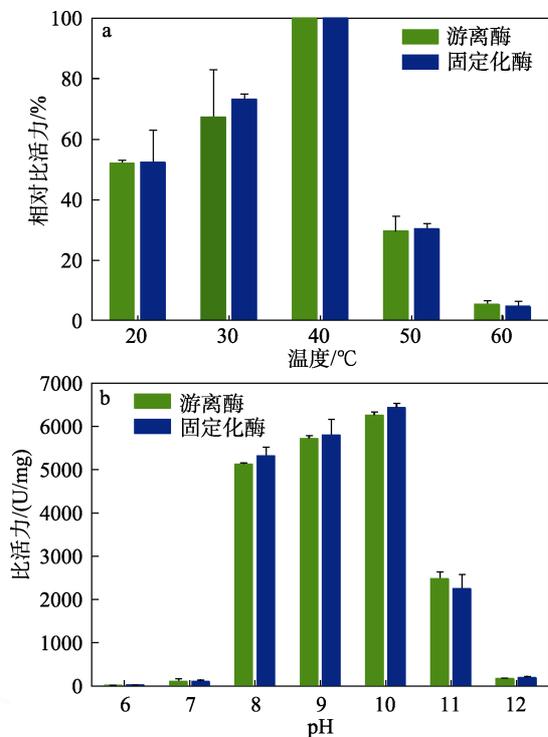


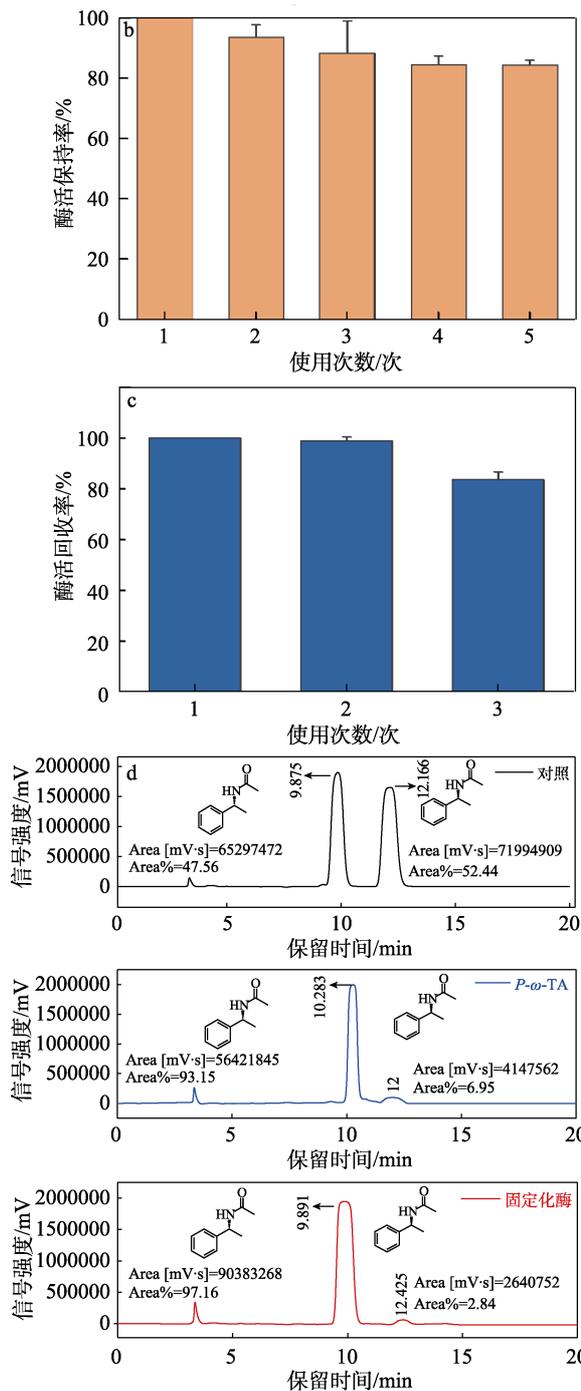
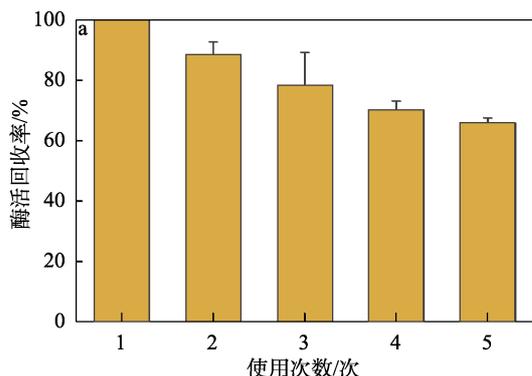
图 5 固定化 *P-ω*-TA 适应性及动力学测试: 温度适应性  
测试 (a); pH 适应性测试 (b)

Fig. 5 Stability and kinetic tests of immobilized *P-ω*-TA:  
Temperature adaptability test (a); pH adaptability  
test (b)

由图 5 可知, 经固定化 *P-ω*-TA 的适应性总体  
有所提高, 且相应 pH 及温度条件下固定化酶的  
比活力及相对比活力总体略高于天然 *P-ω*-TA。

## 2.6 固定化 *P-ω*-TA 的回收和再利用

在将(*S*)- $\alpha$ -甲基苄胺转化为苯乙酮后, 通过差  
速离心将固定化的 *P-ω*-TA 从反应混合物中分离,  
并重新悬浮以进行下一次的生物催化。整个回收  
和再利用步骤重复了 5 次, 并对每次的酶活性进  
行了测定, 结果见图 6。



Area 代表洗脱峰面积, 即峰高与保留时间的积分值, Area% 代表  
同一次洗脱中 2 个手性对映体的洗脱峰面积占总洗脱峰面积  
的百分数

图 6 固定化 *P-ω*-TA 表征: 苯乙酮为产物酶活回收测试  
(a); 苯乙酮为产物酶活保持率测试 (b); (4*S*)-  
四氢萘酮为产物酶活回收测试 (c); 固定化 *P-ω*-TA  
的(*S*)-型选择性验证 (d)

Fig. 6 Immobilization *P-ω*-TA characterizations: Enzymatic  
recovery test for acetophenone as product (a);  
Acetophenone as product enzyme activity retention  
rate test (b); Enzymatic recovery test for  
(4*S*)-tetralone as product (c); Validation of (*S*)-type  
selectivity for immobilized *P-ω*-TA (d)

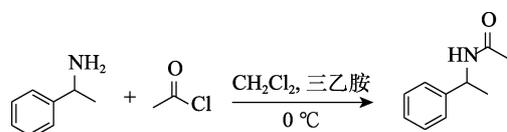
由图 6 可知, 在催化应用中, 每次酶活回收

率均>91%, 经 5 次催化后, 最终酶活回收率>65% (图 6a)。扣除每次离心回收 T4 噬菌体衣壳损失造成的酶量损失 5% (以每次回收的衣壳在 SDS-PAGE 上分析测得), 经 5 次催化, 最终酶活保持率约为 84% (图 6b)。且以(4S)-四氢萘酮为目标产物的酶活回收测试中, 经 3 次反应后, 酶活回收率约为 85% (图 6c)。这表明通过  $P$ - $\omega$ -TA 的固定化成功建立了酶的回收和再利用步骤。

建立的离心回收固定化酶方式由于离心过程中 T4 噬菌体衣壳的损失对于酶活回收造成了一定的影响, 如能对 T4 噬菌体衣壳的回收方式进行优化, 如将 T4 噬菌体衣壳结合与磁珠载体回收方式相结合等, 则可能进一步降低固定化酶损失。

### 2.7 固定化 $P$ - $\omega$ -TA 的(S)-型选择性验证

为了验证固定化  $P$ - $\omega$ -TA 的(S)-型选择性, 使用外消旋  $\alpha$ -甲基苄胺作为胺供体。该酶的(S)-型选择性会将(S)- $\alpha$ -甲基苄胺转化为苯乙酮, 而(R)- $\alpha$ -甲基苄胺则不参加反应。为了确认该酶的生物催化活性只针对(S)-型胺, 将催化反应后剩余的胺通过乙酰氯处理生成  $N$ -(1-苯乙基)乙酰胺, 并使用 HPLC 分析反应产物。反应式如下:



(R)- $N$ -(1-苯乙基)乙酰胺和(S)- $N$ -(1-苯乙基)乙酰胺的保留时间分别约为 10 和 12 min。通过固定化  $P$ - $\omega$ -TA 的生物催化作用, (S)- $N$ -(1-苯乙基)乙酰胺的 HPLC 峰值显著降低, (R)- $N$ -(1-苯乙基)乙酰胺的对映体过量值为 94%, 即保留了(S)-型转氨酶的立体选择性。该立体选择性与未固定化的  $P$ - $\omega$ -TA 一致 (图 6d)。

### 2.8 固定化 $P$ - $\omega$ -TA 催化制备(4S)-四氢萘酮能力验证

$^1\text{H}$ NMR、 $^{13}\text{C}$ NMR、HRMS 反应产物分析证实了(4S)-四氢萘酮的产生。通过高效液相检测产物的对映体过量值>99%, 证实了固定化  $P$ - $\omega$ -TA 对(4S)-四氢萘酮的合成能力的保留。

## 3 结论

本研究证明了 T4 噬菌体衣壳可以作为良好的酶固定化载体。作为生物纳米颗粒, T4 噬菌体衣壳具有均匀的粒径和有序的表面酶固定化位点。每个衣壳表面的 870 Soc 结合位点有利于酶的高密度固定, 而 Hoc 结合位点则提供了额外的灵活性。通过自组装亲和结合实现酶的固定化, 过程温和且方便,

有利于保持酶活。利用 T4 噬菌体衣壳固定化的  $P$ - $\omega$ -TA 是一种在重要抗抑郁药舍曲林的合成中具有重要价值的酶。通过将  $P$ - $\omega$ -TA 改造成 Soc 的融合酶, 使  $P$ - $\omega$ -TA 成功地通过自组装固定化在 T4 噬菌体衣壳上, 且拷贝数较高。固定化的  $P$ - $\omega$ -TA 保持了完整的活性及适应性, 并显示出可回收和再利用的能力。固定化的  $P$ - $\omega$ -TA 具有(S)-型选择性。应用 T4 噬菌体衣壳固定化的  $P$ - $\omega$ -TA 可以降低对(4S)-四氢萘酮进行手性拆分的生物催化成本, 有助于建立更环保的舍曲林合成路线。本研究也为以 T4 噬菌体衣壳作为酶固定化载体, 在合成药物活性成分方面进行酶的生物催化提供了良好范例。

### 参考文献:

- [1] STRINGARIS A. What is depression?[J]. Journal of Child Psychology and Psychiatry, 2017, 58(12): 1287-1289.
- [2] PEARCE M, GARCIA L, ABBAS A, *et al.* Association between physical activity and risk of depression: A systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Psychiatry, 2022, 79(6): 550-559.
- [3] HONG F Z, QIU J Q, ZHANG S S, *et al.* Fetal congenital cardiac and vascular disorders associated with sertraline treatment during pregnancy: Analysis of FAERS data[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 9914931.
- [4] LEE S H, KIM I S, LI Q R, *et al.* Stereoselective amination of chiral benzylic ethers using chlorosulfonyl isocyanate: Total synthesis of (+)-sertraline[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2011, 76: 10011-10019.
- [5] SUN W Y, JIN Y, WANG C, *et al.* Stereoselective separation of isomeric sertraline with analytical countercurrent chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1617: 460834.
- [6] QUALLICH G J. Development of the commercial process for Zoloft®/sertraline[J]. Chirality, 2005, 17: S120-S126.
- [7] FUSTER S, LAZARO R, HERRERA L, *et al.* Asymmetric allylation/ring closing metathesis: One-pot synthesis of benzo-fused cyclic homoallylic amines. Application to the formal synthesis of sertraline derivatives[J]. Organic Letters, 2013, 15: 3770-3773.
- [8] GAVIN D P, REEN F J, ROCHA-MARTIN J, *et al.* Genome mining and characterization of a novel transaminase with remote stereoselectivity[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 1-15.
- [9] CLOUTHIER C M, PELLETIER J N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis[J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(4): 1585-1605.
- [10] MALLIN H, HÖHNE M, BORNSCHEUER U. Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 191: 32-37.
- [11] YAP M L, ROSSMANN M G. Structure and function of bacteriophage T4[J]. Future Microbiology, 2014, 9(12): 1319-1327.
- [12] BLACK L W, RAO V B. Structure, assembly, and DNA packaging of the bacteriophage T4 head[J]. Advances in Virus Research, 2012, 82: 119-153.
- [13] GAMKRELIDZE M, DABROWSKA K. T4 bacteriophage as a phage display platform[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(7): 473-479.
- [14] JIANG J, ABU-SHILBAYEH L, RAO V B. Display of a PorA

- peptide from *Neisseria meningitidis* on the bacteriophage T4 capsid surface[J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65 (11): 4770-4777.
- [15] WU J M, TU C C, YU X L, *et al.* Bacteriophage T4 nanoparticle capsid surface SOC and HOC bipartite display with enhanced classical swine fever virus immunogenicity: A powerful immunological approach[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 139 (1): 50-60.
- [16] REN Z J, TIAN C J, ZHU Q S, *et al.* Orally delivered foot-and-mouth disease virus capsid protomer vaccine displayed on T4 bacteriophage surface: 100% protection from potency challenge in mice[J]. *Vaccine*, 2008, 26 (11): 1471-1481.
- [17] TAO P, LI Q, SIVACHANDRA S B, *et al.* Bacteriophage T4 as a nanoparticle platform to display and deliver pathogen antigens: Construction of an effective anthrax vaccine[J]. *Recombinant Virus Vaccines: Methods and Protocols*, 2017, 1581: 255-267.
- [18] TAO P, MAHALINGAM M, ZHU J G, *et al.* A bacteriophage T4 nanoparticle-based dual vaccine against anthrax and plague[J]. *American Academy of Microbiology*, 2018, 9: e01926.
- [19] CHEN Z G, SUN L, ZHANG Z H, *et al.* Cryo-EM structure of the bacteriophage T4 isometric head at 3.3 Å resolution and its relevance to the assembly of icosahedral viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: E8184-E8193.
- [20] TAO P, MAHALINGAM M, KIRTLEY M L, *et al.* Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines[J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003495.

(上接第 1091 页)

- [35] ZHOU X W, WU G M, WU J D, *et al.* Carbon black anchored vanadium oxide nanobelts and their post-sintering counterpart ( $V_2O_5$  nanobelts) as high performance cathode materials for lithium ion batteries[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16(9): 3973-3982.
- [36] KARADE S S, LALWANI S, EUM J H, *et al.* Coin cell fabricated symmetric supercapacitor device of two-steps synthesized  $V_2O_5$  nanorods[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, 864: 114080.
- [37] CHENG S Q, WENG X F, WANG Q N, *et al.* Defect-rich BN-supported Cu with superior dispersion for ethanol conversion to aldehyde and hydrogen[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2022, 43(4): 1092-1100.
- [38] LI Y M (李艳梅), HAO G D (郝国栋), CUI P (崔平) *et al.* Research progress of electrode material for supercapacitor[J]. *Chemical Industry and Engineering (化学工业与工程)*, 2020, 37(1): 17-33.
- [39] LI M, AI T T, KOU L J, *et al.* Synthesis and electrochemical performance of  $V_2O_5$  nanosheets for supercapacitor[J]. *Aip Advances*, 2022, 12(5): 055203.
- [40] SONG W M (宋伟明), XU L Y (徐立洋), SUN L (孙立), *et al.* Synthesis of MCM-41 mesoporous carbon materials and their electrochemical performance[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2017, 34(2): 128-133.
- [41] ZHANG Y L (张亚利), SUN D T (孙典亭), GUO G L (郭国霖), *et al.* Transfer rule of equivalent circuits of similar plots on the impedance complex plane and on the capacitance complex plane for an AC impedance measurement ( $\Pi$ )[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2000(7): 1086-1092.
- [42] LIU H L, YU T T, SU D Q, *et al.* Ultrathin Ni-Al layered double hydroxide nanosheets with enhanced supercapacitor performance[J]. *Ceramics International*, 2017, 43(16): 14395-14400.
- [43] PENG C Y, JIN M M, HAN D, *et al.* Structural engineering of  $V_2O_5$  nanobelts for flexible supercapacitors[J]. *Materials Letters*, 2022, 320: 132391.
- [44] JAIN A, MANIPPADY S R, TANG R, *et al.* Vanadium oxide nanorods as an electrode material for solid state supercapacitor[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 21024.
- [45] HOU Z Q, YANG Z G, GAO Y P, *et al.* Synthesis of vanadium oxides nanosheets as anode material for asymmetric supercapacitor[J]. *Chemical Papers*, 2018, 72(11): 2849-2857.
- [46] KARACA E, PEKMEZ K, PEKMEZ N Ö. Electrosynthesis of polypyrrole-vanadium oxide composites on graphite electrode in acetonitrile in the presence of carboxymethyl cellulose for electrochemical supercapacitors[J]. *Electrochimica Acta*, 2018, 273: 379-391.
- [47] LIU H J, ZHU W L, LONG D F, *et al.* Porous  $V_2O_5$  nanorods/reduced graphene oxide composites for high performance symmetric supercapacitors[J]. *Applied Surface Science*, 2019, 478: 383-392.