含铁酶催化脂肪酸脱羧制备脂肪烃的微观机理研究进展

张士清, 刘永军*

山东大学化学与化工学院, 济南 250100

* 联系人, E-mail: yongjunliu_1@sdu.edu.cn

2020-11-18 收稿, 2021-01-20 修回, 2021-02-26 接受, 2021-03-10 网络版发表

国家自然科学基金(21773138, 22073056)资助

摘要 能源消耗的增加、化石资源的减少和环境问题对再生能源的研发提出了严峻挑战. 近年来, 烷/烯烃的生物合成是该领域的研究热点之一. 因为脂肪烃类不仅是高值化学品, 而且是理想的可再生燃料. 人们已相继发现了一些能催化烃类合成的蛋白酶, 它们可以催化脂肪酸及其衍生物脱羧生成相应的烷/烯烃, 为探索化石燃料的可再生替代品提供了思路. 这些蛋白酶主要包括一些含铁酶, 它们利用非血红素单核铁、双核铁和血红素铁等催化脂肪酸及其衍生物脱羧或脱乙酰基反应. 本文主要以几类代表性的含铁酶为例, 综述了这些酶催化脂肪酸生物合成脂肪烃的最新研究进展, 重点回顾理论化学方法对酶催化微观机制的探索.

关键词 含铁酶, 脂肪酸脱羧, 烷/烯烃, 催化机理

随着人类社会的进步, 人们对能源的消耗不断增加, 其中对化石燃料的依赖尤为突出. 据2018年的数据统计, 化石燃料的消耗比重占全球能源消耗总量的84.7%^[1]. 化石燃料的过度开发不仅带来日益严重的能源危机, 还会引发一系列的环境问题, 如空气质量恶化、土壤酸化等, 不利于社会的可持续发展. 在2019年举办的第二十一届中国科学技术协会年会上, “可再生合成燃料”成为关注的焦点之一, 也对可再生能源的研发提出了更高的要求.

近年来, 烷/烯烃的生物合成是“可再生合成燃料”领域的研究热点之一^[2-9], 因为烃类不仅是高值化学品, 而且是理想的可再生燃料; 与“第一代”生物燃料(主要是乙醇、脂肪酸甲酯等)相比, 烃类燃料具有高能量密度、低吸湿性和低挥发性等优点, 且能与现有发动机和运输设施相兼容, 是传统液体化石燃料的最佳替代品.

虽然大约60年前就发现许多植物、昆虫、微生物

和微藻类可代谢产生烃类物质^[9], 但引发人们对烃类生物合成的极大兴趣始于2010年Schirmer课题组^[10]对海洋绿球蓝细菌生物合成烷烃路径的解析. 通过近几年的努力, 人们已相继发现了一些能催化烃类合成的蛋白酶^[2-8], 如醛脱乙酰酶(ADO、CYP4G、CER)、脂肪酸脱羧酶(UndA、UndB、OleT)、聚酮合成酶(Ols)以及硫解酶复合体系(OleABCD)等. 图1给出了已发现的几类含铁酶催化脂肪酸中间体生物合成烃类的主要途径^[11].

研究者利用实验方法对催化脂肪烃生物合成的微生物和蛋白酶进行了大量研究^[11,12], 通过动力学实验获得了较多酶催化反应的动力学信息, 并结合晶体结构对酶催化反应过程进行了推测, 提出了酶催化反应的大致机理, 也有学者采用理论化学方法解析了某些酶催化反应的微观机制. 本文主要对5种催化脂肪烃生物合成的代表性含铁酶包括OleT、UndA、UndB、ADO和CYP4G的重要研究进展进行综述, 并对酶催化在可再生合成燃料中未来的发展及应用进行讨论.

引用格式: 张士清, 刘永军. 含铁酶催化脂肪酸脱羧制备脂肪烃的微观机理研究进展. 科学通报, 2021, 66: 1678–1688

Zhang S Q, Liu Y J. Research progress of the decarboxylation mechanisms of fatty acids to generate aliphatic hydrocarbons catalyzed by iron-containing enzymes (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 1678–1688, doi: 10.1360/TB-2020-1482

1 催化合成 α -烯烃的3种含铁酶

如图1所示, 脂肪酰ACP首先在TesA作用下转换为脂肪酸中间体, 然后在OleT、UndA和UndB的催化作用下脱羧生成相应的 α -烯烃, 其中OleT为血红素含铁酶, UndA和UndB为非血红素含铁酶, 以下分别对这3种酶的最新研究进展进行介绍。

1.1 OleT

2011年, Schirmer课题组^[13]从革兰氏阳性菌*Jeotgalicoccus* sp. ATCC 8456中发现了一种 α -烯烃合成酶, 并命名为OleT_{JE}。OleT_{JE}属于CYP152家族, 主要催化中、长链脂肪酸(C₁₂~C₂₀)脱羧生成相应的 α -烯烃。晶体结构分析表明, OleT_{JE}的三级结构与P450_{BSP}酶(一种催化脂肪酸 β -羟基化反应的酶)相似, 但由于两者的亚铁血红素结构及组氨酸结构存在微小差异, OleT_{JE}主要催化氧化脱羧反应, 而P450_{BSP}主要催化羟基化反应^[14]。2015年, 对OleT_{JE}催化活性的改造也取得了重要进展, Denig等人^[15]利用O₂、NAD(P)H和假单胞氧还原蛋白CamAB构建了电子转移链, 使OleT对C₄~C₉脂肪酸的脱羧效率大大提高, 将 α -烯烃的总效价提高到930 mg/L, 转化数提高到2000以上。他们认为这种活性和底物选择性的改变可能是由于电子供给体系和底物结合能力的变化引起的。

图1 (网络版彩色) 含铁酶催化脂肪酸/醛生物合成烷/烯烃的主要途径^[11]。TesA和AAR分别是硫酯还原酶和脂肪酰基转运蛋白还原酶
Figure 1 (Color online) Summary of the biosynthetic pathways of hydrocarbon synthesis derived from fatty acid derivatives catalyzed by iron enzymes^[11]. TesA and AAR refer to thioesterase and aminoacyl ACP reductase, respectively

近年来, 根据生物化学实验和光谱分析, 研究者推测了OleT催化脂肪酸脱羧生成 α -烯烃或羟基脂肪酸的机理^[13,14,16~18], 如图2所示。OleT催化的脱羧或羟基化反应包括以下几个步骤: (i) 脂肪酸通过取代轴向配位的水分子与铁中心结合^[19]。研究发现, OleT_{JE}在催化反应中需要的电子和氧供体可以由NAD(P)H和O₂提供, 也可以由单独的H₂O₂提供^[14,20,21]。因此, 化合物0(Compound 0, Fe(III)-OOH⁻)可以在O₂和NAD(P)H共同参与下生成(a~d), 也可以直接利用过氧化氢生成(ii~iv); (iv, v) 化合物0经过质子化、脱水生成高价铁氧复合物Fe(IV)=O(Compound I)。已经在OleT_{JE}的催化反应中检测到了化合物I^[22]; (v, vi) 化合物I从脂肪酸的 β -碳上抽取一个氢原子, 生成底物自由基和Fe(IV)-OH(Compound II)。化合物II可催化底物反应生成两种产物, 即通过脱羧形成 α -烯烃(g, h)或通过羟基回弹生成 β -羟基化的脂肪酸(i, j)。

在OleT催化脂肪酸氧化脱羧过程中会产生大量的副产物, 即 α -和 β -羟基化的脂肪酸。为了探讨这些竞争反应, 2016年英国曼彻斯特大学的de Visser课题组^[23]运用QM/MM(量子力学与分子力学相结合)方法以花生四烯酸为底物研究了OleT_{JE}如何催化产生3种可能的产物, 并对羟基化和脱羧反应的势垒进行了计算, 进一步利用价键模型揭示了两种竞争反应的电子起源。经研究证实, OleT_{JE}的催化机理是由高活性的卟啉铁氧自由基首先夺取脂肪酸上的氢原子来启动脱羧和羟基化反应。他们发现脱羧反应与底物自身的结构特征有很大关系, 比如羰基C与C α 键的强度、C α -C β 形成 π 键所需的能量以及副产物CO₂的电子亲和能等。研究还表明, 活性口袋蛋白质残基的极性以及底物和Fe-O中心的氢键作用都会增加羟基化反应的势垒。因此可以通过工程改造活性口袋的相关残基来阻止羟基反弹通路或使用底物类似物来调整脱羧和羟基化反应的选择性。这些计算结果可为OleT的工程改造提供理论依据。

为了进一步分析OleT_{JE}所催化的氧化脱羧、 α/β 位的羟基化以及去饱和化产物的分布情况与底物的结构及结合模式的关系, de Visser课题组^[24]在2019年又以2-甲基丁酸为底物, 计算研究了OleT_{JE}的催化反应。用密度泛函方法优化得到了二重态和四重态下血红素铁与底物结合的构型, 主要可能存在8种形式的异构体, 包括3种R型异构体和5种S型异构体。高活性的Fe=O复合物可抽取底物C α 上的氢原子引发反应, 并最终得到去饱和化和 α -羟基化的产物, 而底物C β 氢原子的抽取可

图2 (网络版彩色)OleT催化脂肪酸脱羧生成 α -烯烃或 β -羟基脂肪酸可能的机理^[13,14,16-18]

Figure 2 (Color online) OleT-catalyzed decarboxylation of fatty acids to produce α -alkenes or β -OH fatty acids^[13,14,16-18]

产生 β -羟基化、去饱和化和脱羧产物。以其中的一种S型反应物S1为例, 计算结果表明, 经过 C_{α} -H和 C_{β} -H的抽取, 可分别产生 C_{α} 自由基和 C_{β} 自由基中间体。这两步抽氢过程的势垒差别不大, 二重态时分别为15.6和14.3 kcal/mol, 四重态时分别为13.8和10.3 kcal/mol。然而, 在接下来的脱羧过程中, 在四重态时的反应势垒高达20.1 kcal/mol, 这比2016年关于OleT_{JE}催化花生四烯酸脱羧的反应势垒(四重态时为6.7~8.4 kcal/mol)高出很多^[23], 说明不同底物对应的脱羧反应势垒可存在很大差别; 底物的位置也决定了铁氧化物(化合物I)对底物的可接近程度, 从而决定了反应的区域选择性和化学选择性。研究表明, 不同的反应物, 其产物分布会有很大不同^[24]。

价键模型曾被用于研究反应能垒、预测过渡态和中间体, 从而预测化学反应性^[25-28]。为了探讨电子结构对羟基反弹、去饱和化及脱羧过程的影响, de Visser课题组^[24]使用价键(VB)模型以经验方法估算了不同位置的氢原子抽取反应的势垒, 并以此分析了OleT_{JE}催化反应的区域选择性。结果表明, 对于肉豆蔻酸(1a)来说, OleT_{JE}催化抽取 α -H和 β -H的能垒差别不大, 因此抽氢反应没有明显的选择性。而对于2-甲基丁酸(2a)和2-苯

基丁酸(3a), OleT_{JE}明显选择性地催化 α -H的抽取反应(图3)。OleT_{JE}催化不同的底物, 或者同种底物不同位置的氢原子对应抽取反应的能垒不同, 使得催化反应表现出不同的选择性, 因此可以通过使用不同底物来调控反应的选择性。

2020年, de Visser课题组^[29]还研究了OleT_{JE}活性位点的关键残基对脱羧反应的影响。他们通过对活性口袋的残基进行双突变(Asn242Arg/Arg245Asn)构建了OleT_{JE}突变酶体系。计算发现这种突变影响了底物的结合, 使得底物 C_{β} -H的活性增强, 进而可能增加 α -烯烃产品的产率。研究结果证实了可以通过残基突变来提高反应选择性的推测, 为改进酶反应选择性提供了参考。de Visser课题组^[30]还研究了外加电场对OleT_{JE}反应机理和反应性的影响。计算发现, 外加电场会影响 β -H和 α -H抽取反应的顺序, 但对脱羧过程影响不大, 沿x或y轴施加负电场可以使去饱和化反应比羟基化反应更容易发生。

1.2 UndA

UndA最初是由Zhang课题组^[31]在2014年通过从已

图3 (网络版彩色)2-甲基丁酸 α -或 β -位抽氢过程的价键示意图^[24]. 黑点代表价电子, 两点之间的线代表由两个电子占据的成键轨道
Figure 3 (Color online) VB depiction of hydrogen atom abstraction from the α - or β -position of 2-methylbutyric acid^[24]. Dots represent valence electrons, and the line between two dots represents a bonding orbital occupied by two electrons

知可产生1-十一烯的各种假单胞菌菌株中筛选发现的一种非血红素脱羧酶(称为Pf UndA), 它能专一性地催化中等长度($C_{10}\sim C_{14}$)的脂肪酸脱羧生成相应的 α -烯烃, 其中含有12个碳原子的月桂酸为自然底物. 在2014年报道的晶体结构中, 底物月桂酸上的羧基直接参与Fe的配位, 这样的配位结构可能使得Pf UndA的催化机理与其他非血红素含铁酶不同. 研究还发现, 1个当量的UndA-Fe²⁺需要消耗等当量的O₂, 并产生相同当量的 α -烯烃; 催化实验只能进行1个循环即停止可能是由于电子数目的不平衡引起的, 因为在1个催化循环中, 1个底物分子只提供2个电子, 而将O₂还原需要4个电子. 实验还证明, 催化体系必须含有Fe²⁺, 而Fe³⁺和其他金属离子如Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Co²⁺等完全不能催化反应. 根据生物信息学分析, 在已经公布的基因组中, 至少含有1500个UndA同系物. Zhang课题组^[31]推测, 在底物和O₂与Fe配位后, 可能是通过Fe^{III}-OO $\cdot$ 或Fe^{IV}=O夺取底物的 β -H引发反应.

基于Zhang课题组^[31]得到的Pf UndA晶体结构, 本课题组^[32]在2019年运用QM/MM方法对Pf UndA催化月桂酸氧化脱羧的机理进行了理论研究, 比较了Fe^{III}-OO $\cdot$ 和Fe^{IV}=O引发的两条反应路径的能垒. 计算结果表明, 脱羧反应不容易由Fe^{IV}=O引发, 主要是由于底物的 β -H与Fe^{IV}=O中心相距太远, 不利于氢抽取反应的发生.

在Fe^{III}-OO $\cdot$ 反应路径中, 考虑到底物月桂酸的羧基氧直接与Fe离子配位, 首先研究了底物的不同配位结构对脱羧反应的影响. 当氧气分子与Fe离子采用“end-on”配位模式时, 底物的两个羧基氧原子与铁离子既可以采取双配位模式配位, 也可以采取单配位模式配位. 双配位模式下的反应物模型对应的相对能量更低, 但由于Fe^{III}-OO $\cdot$ 与底物C β -H的距离比较远, 难以发生C β -H的抽取反应. 而单配位模式由于配位氧原子与底物的C β -H处于利于反应的位置, 可以进行C β -H的抽取反应. 研究还发现, 在几种单配位模式中, 底物与Fe-OO中心的相对位置会有所不同, 使得C β -H与Fe-OO中心的相对朝向和距离不同, 对应抽氢反应的势垒存在一定的差别. 在脱羧反应中, 我们还发现只有底物自由基与Fe中心发生电子转移, 脱羧反应才能进行. 由此可以推断, 在Pf UndA催化月桂酸氧化脱羧反应中, 铁离子不仅仅起到活化氧气的作用, 还要接收底物自由基的电子. 计算还表明, Pf UndA虽然可以催化月桂酸的脱羧反应, 但催化活性不高, 这与实验结果是一致的^[31].

2019年, 来源于*P. syringae* pv. *tomato*的UndA(Ps UndA)的晶体结构被Makris课题组^[33]进一步解析. 尽管在Ps UndA的晶体结构中不包含Fe离子, 但通过与另一种酶CADD活性位点的保守残基对比发现, 两者高度一致. 虽然CADD的催化作用尚不明确, 但可以确定它的晶体结构明显包含双核铁中心, 因此可以初步确定Ps UndA应具有双核铁中心. Makris课题组^[33]通过测定穆氏斯堡尔光谱进一步证实了双核铁中心的存在. 2019年, Zhang课题组^[34]重新解析了Pf UndA的晶体结构, 证实了UndA确实是具有双核铁中心的脱羧酶, 并对UndA催化月桂酸氧化脱羧的反应机理提出了修正(图4). 在反应起始, 底物的结合触发了O₂分子与Fe₂(II/II)辅助因子快速配位, 产生过氧-Fe₂(III/III)中间体, 继而发生C β -H抽取和脱羧反应. 脱羧过程中也可能涉及电子转移过程, 但其详细的催化机理至今尚未有人研究.

基于对一些双铁蛋白酶的研究可以推测, 在Pf UndA中双核铁也可能存在4种可能的氧气结合模式(图5). 模式I和II是基于Zhang课题组^[31]提出的假设, 模式III和IV分别基于Zhang课题组^[34]和Fox课题组^[35]的研究. 在最新获得的Pf UndA晶体结构(PDB编号: 6P5Q)基础上, 本课题组^[32]通过手动添加O₂使其与双铁中心结合, 构建了几种包含O₂的Fe₂(III/III)及Fe₂(IV/IV)复合物. 通过与另一种非血红素双铁酶cADO(PDB编号: 2OC5)进行比较发现, 在cADO晶体结构中两个铁原子

图4 (网络版彩色)UndA双核铁中心催化月桂酸氧化脱羧反应的可能机理^[34]

Figure 4 (Color online) Oxidative decarboxylation mechanism of LA catalyzed by the diiron center of UndA^[34]

的距离为3.23 Å, 经DFT方法优化后为3.66 Å^[36]。然而, 在Pf UndA晶体结构中两个铁原子的距离为4.85 Å。并且在我们构建的几种复合物中, 与Fe配位的氧原子与底物的C_β-H之间的距离均大于5.5 Å, 如此远的距离显然不利于氢抽取反应的发生。此外, C_β-H与活性氧的相对朝向也不利于氢抽取反应。因此, 我们推测, 在C_β-H的抽取过程中, 双铁活性中心和底物都需进行一系列的构象变化, 以利于C_β-H的抽取来启动脱羧反应。

de Visser课题组^[37]也构建了一系列单铁模式下Pf UndA的反应物模型, 比较了几种不同活性位点残基质子化状态对反应的影响。计算结果表明, UndA在Fe^{III}-OO⁻模式下的抽氢反应是非常缓慢的, 这与我们的计算结果一致^[32]。除此之外, 他们还构建了双铁反应物模型, 与图5中的模式II类似。在他们构建的模型中, 底物与双铁中心的相对位置及朝向已经过调整, 活性氧与C_β-H的距离变为2.556 Å^[37]。基于此模型, 他们进一步计算了C_β-H的抽取过程。计算结果显示, 抽氢过程的能垒为22.4 kcal/mol, 比一般的抽氢能垒高一些^[38,39]。但与单核铁模型中所引发的C_β-H抽取反应相比, 双铁模型下的反应势垒更低。与单核铁模型不同的是, 双核铁模型下, 抽氢过程与脱羧反应是协同发生的, 即通过构型优化计算不能得到抽氢反应的中间体, 抽氢反应后脱羧反应很容易发生。但由于整个反应对应的能垒较

高, 说明双核铁的催化活性也不高。

1.3 UndB

UndB是2015年Zhang课题组^[40]从少数假单细胞发现的另一类非血红素脱羧酶。与UndA类似, UndB也能催化中等长度(C₁₀~C₁₈)脂肪酸脱羧生成相应的α-烯烃。但UndB只对含10~16碳的脂肪酸表现出较高的活性。序列同源比对表明UndB属于膜结合的脂肪酸脱羧酶, 与其他已知的α-烯烃合成酶相比, UndB具有较高的转化率。然而, UndB的同系物只存在于少数假单胞菌和相关物种, 不像UndA广泛存在。据推测, UndB的催化机理可能与UndA相似, 也是通过抽取C_β-H来启动脱羧反应, 最终生成α-烯烃和CO₂副产物, 如图6所示^[11]。然而, 至今没有得到UndB的晶体结构, 限制了对于其催化机理进行更为详细的研究。UndB的发现扩大了将脂肪酸中间体转化为碳氢化合物的酶库, 增加了通过微生物发酵促进中链α-烯烃进行工业生产的可能性。

2 催化合成烷烃的两种含铁酶

如图1所示, 脂肪酰ACP在AAR(脂肪酰基转运蛋白还原酶)作用下首先转换为脂肪醛中间体, 然后在含铁酶ADO和CYP4G的催化作用下脱甲酰基生成相应的烷烃, 其中ADO会催化产生甲酸副产物, 而CYP4G催化反应的副产物是CO₂。以下分别对这两种酶的研究进展进行介绍。

2.1 ADO

作为开创性的工作, Schirmer课题组^[10]阐明了由脂肪酰ACP到烷烃的合成路径。如图1所示, 脂肪醛中间体能在脱甲酰氧化酶(ADO)催化下生成相应的烷烃。来源于蓝藻细菌的ADO(cADO)主要催化C₁₅和C₁₇烷烃的合成。其实早在2006年ADO的晶体结构(PDB编号: 2OC5)就已经被解析出来, 只是当时对其催化功能不了解。ADO是一种非血红素双核铁氧化酶, 其活性位点与核糖核苷酸还原酶RNR R2、细菌多组分单加氧酶BMM以及甲烷单加氧酶MMO等类似。经穆斯堡尔谱证实ADO和cADO存在双核二价铁或三价铁^[41~43]。Krebs课题组^[44]和Marsh课题组^[45]经过进一步研究确定了羰基碳原子最后演变为甲酸而不是CO, 并推测了可能的反应机理: 双核铁中心首先结合氧气分子, 并经历一系列复杂的电子转移、Fe²⁺氧化、O-O和C-C断裂以及自由基夺氢等过程才能完成脱甲酰反应^[46]。已有

图 5 (网络版彩色)Pf UndA酶的晶体结构及其活性位点中双铁与氧气可能的结合模式. (a) 来自*Pseudomonas fluorescens* Pf-5的Pf UndA的晶体结构(左)、两条蛋白链的重叠图(中)以及A链的活性中心的结构(右); (b) UndA或其他非血红素双铁酶中氧气与双铁的4种可能结合模式^[33-35]; (c) 基于Pf UndA晶体结构(PDB编号: 6P5Q)构建的6种Fe₂(III/III)及Fe₂(IV/IV)复合物的结构^[32]
Figure 5 (Color online) The crystal structure of Pf UndA, and the possible binding modes of dioxygen with the diiron center. (a) Crystal structure of Pf UndA from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (left), overlap of two chains (middle), and the active site of chain A (right). (b) Four possible binding modes of dioxygen in UndA or nonheme diiron enzymes^[33-35]. (c) Six constructed models of Fe₂(III/III) complexes and Fe₂(IV/IV) intermediates^[32] based on the crystal structure of Pf UndA (PDB ID: 6P5Q)

研究^[47,48]进一步提出了ADO催化反应可能的反应路径. 最近的紫外可见停流检测和穆斯堡尔谱学的研究^[41]发现有过氧半缩醛物种的生成. 实验上检测到在反应过程中存在“radical clock”来支持C-C键断裂的自由基机制^[49]. cADO的独特之处在于, 尽管它利用了氧化剂O₂, 但其催化的脱甲酰反应是氧化还原中性的^[42]. 虽然实验上已对cADO的催化机理作了相应的研究, 但在反应的最后阶段, 烷基自由基夺取哪个残基上的H目前还不确定.

研究cADO催化反应面临的难题之一是, 如何澄清

实验上获得的过氧半缩醛中间体的穆斯堡尔谱所对应的结构. 2016年, 陈辉课题组^[36]用QM/MM方法对来源于蓝细菌的脱甲酰酶的电子结构和光谱性质进行了研究. 首先, 他们构建了实验上所提出的过氧半缩醛中间体所可能的“C-like”(μ-η²:η⁰配位模式)的两种构型, 分别命名为C₁和C₂. 在C₁模型中, 氧气分别与两个铁原子配位, 底物(饱和的C₁₈脂肪醛)只与Fe₂配位; 而在C₂模型中, 氧气只与Fe₂配位且底物与Fe₁配位. 通过对换C₁与C₂模型中的配位残基、氧气及底物的位置来研究结构的对称性. 计算结果表明过氧半缩醛中间体是不对称

图6 (网络版彩色)UndB催化合成烯烃可能的反应机理^[11]
Figure 6 (Color online) Possible mechanisms for the alkene synthesis catalyzed by UndB^[11]

的,从理论上揭示了双核铁中心由对称结构到不对结构转变的本质。他们还通过计算底物和O₂与双铁核心结合的穆斯堡尔谱并与实验数据比较,进一步确定过氧半缩醛中间体采用C₁模型。

陈辉课题组^[36]研究还发现,在cADO催化底物生成相应烷烃的过程中,关键中间体过氧半缩醛的生成是整个催化反应的决速步骤,此后的O-O/C-C键的断裂反应都很容易发生(图7)。在催化过程中,第160号组氨酸残基(His160)由最初在晶体结构中Fe₂配位到在形成过氧半缩醛中间体时不配位,再到反应最后又变成配位,这一可逆解离行为深化了对非血红素酶在催化反应中结构演化的认识。

2.2 CYP4G

除了ADO外,来源于昆虫的CYP4G家族也可以催化长链脂肪醛脱去甲酰基生成烷烃^[50]。与ADO不同的是CYP4G属于细胞色素P450酶,脂肪醛上的羰基最后演变为CO₂。图8给出了CYP4G的催化脱甲酰基产生烷烃的大致反应机理^[11,48,51]。与大多数的P450酶一样,CYP4G也是利用化合物I作为催化活性中心,将甲酰基氧化成二氧自由基然后发生C-C键断裂,产生烷烃自由基,烷烃自由基再抽取与铁配位的甲酰基上的氢原子最终生成烷烃^[52]。CYP4G的催化机理仍有许多问题需要澄清,例如,化合物I能否先抽取底物上的氢原子,产生的自由基中间体如何被保护以确保后续反应的进行。虽然实验上提出CYP4G可以在活性位点形成并保留自由基的反应是由于其独特的螺旋结构决定的^[50],但是具体是由哪些关键残基起主要作用仍需进一步探

图7 (网络版彩色)基于QM/MM计算得到的cADO的催化机理^[36]。
ΔE为能量(kcal/mol)
Figure 7 (Color online) Reaction mechanism for cADO including QM/MM structural information^[36]. ΔE represents the energy barrier (kcal/mol)

图8 (网络版彩色)CYP4G酶催化脂肪醛生成烷烃的机理^[11]
Figure 8 (Color online) Proposed mechanism for hydrocarbon production catalyzed by CYP4G^[11]

究。此外,在CYP4G催化的反应中,是否也会发生P450酶常见的H-抽取反应,以及能否通过改变底物在活性位点的结合来提高反应的选择性和反应效率等也需要进一步研究。总的来说,目前对于CYP4G催化的脱甲酰基反应机理研究还不够充分,特别是受到晶体结构缺失的限制,还未见关于其催化机理的理论研究报道。

需要说明的是,这些酶催化反应的底物往往尺寸较大,底物的进入和产物释放也可能影响整个催化反应的效率,但目前还没有这方面的研究报道。通过比较这些酶的晶体结构,如OleT_{JE}(晶体编号: 4L40)、UndA

(晶体编号: 6P5Q)和ADO(晶体编号: 2OC5),发现这些酶的活性中心都处于整个蛋白酶的边缘,应该有利于底物的结合和产物的释放。因此,我们认为底物运输和产物释放对催化反应的速率应该影响不大。

总之,催化脂肪酸/醛生成烃类的含铁蛋白酶大致可归为两类:一类是血红素含铁酶,如OleT_{JE}和CYP4G;另一类是非血红素含铁酶,如UndA、UndB和ADO,它们可以催化游离的脂肪酸发生脱羧或脂肪醛脱甲酰基生成相应的烷/烯烃。由于这些脂肪酸/醛分子不含其他的功能团,脱羧/脱甲酰基过程(断裂C-C键)往往需要大量的能量,所以这些蛋白酶催化反应中都涉及高活性的Fe-O复合物。对这些活性位点的化学过程进行研究也可为人们寻找传统脱羧反应的催化剂提供有益的思路。

3 总结与展望

烷/烯烃的生物合成是近几年的研究热点之一,本文从对烷/烯烃生物合成的研究现状入手,重点论述了几种含铁酶在烷/烯烃生物合成中的最新实验进展和理论成果。

科学家已经通过大量的动力学研究及残基突变实验获得了酶催化反应的大量信息,并结合晶体结构对这些酶的催化机理进行了推测,在由脂肪酸(醛)生物合成脂肪烃方面取得了令人可喜的研究进展。但总的来说,这些研究目前仍处于初始阶段,在工程应用方面仍面临许多挑战,如这些蛋白酶在异源宿主中的表达还

存在困难,催化效率还非常低,非生产性的电子转移难以控制等。随着晶体结构的不断解析,理论化学方法也被用于对这些酶催化过程的研究。这些研究主要在晶体结构基础上,运用量子力学、分子力学和分子动力学模拟方法解析脂肪酸脱羧过程的最可能路径,揭示不同酶催化脱羧过程的微观机制,找出了影响酶催化活性和反应选择性的关键因素。在这些酶的催化过程中,O₂或底物结合前后,Fe核心涉及复杂的电子结构变化,这些变化也会影响催化活性。对于脱羧反应机理,一般要经过β-H的抽取反应,且这一步通常是整个催化反应的决速步。底物在活性位点的结合模式会影响铁氧活性中心对底物的可接近程度,进而影响反应速率;不同的底物在脱羧过程中会表现出很大的反应选择性,活性中心相关蛋白质残基的质子化状态也会影响反应选择性。我们可以通过改变底物的结合模式,使用不同的反应底物或改变活性口袋来提高脱羧反应的选择性,以提高通过酶催化反应生物合成烷/烯烃的效率。

总的来说,关于酶催化脂肪烃生物合成的实验与理论研究还处于起步阶段,虽然通过酶催化脱羧反应制备脂肪烃为我们寻找可再生能源提供了可行的思路,但离实际应用还需要相当时间的研究探索。相信经过实验和理论工作者的共同努力,通过生物合成制备烷/烯烃一定会成为一种可行的可再生能源替代策略。可再生能源发展已成为世界各国应对日益严峻的能源环境问题的必由之路。

参考文献

- 1 British Petroleum (BP). BP Statistical Review of World Energy 2019. London: BP Press, 2019
- 2 Yu A Q, Juwono N K P, Leong S S J, et al. Production of fatty acid-derived valuable chemicals in synthetic microbes. *Front Bioeng Biotechnol*, 2014, 2: 78
- 3 Kang M K, Nielsen J. Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of microorganisms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44: 613–622
- 4 Janßen H J, Steinbüchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 7
- 5 Yan J, Liu Y, Wang C, et al. Assembly of lipase and P450 fatty acid decarboxylase to constitute a novel biosynthetic pathway for production of 1-alkenes from renewable triacylglycerols and oils. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 34
- 6 Akhtar M K, Turner N J, Jones P R. Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 87–92
- 7 Rabinovitch-Deere C A, Oliver J W K, Rodriguez G M, et al. Synthetic biology and metabolic engineering approaches to produce biofuels. *Chem Rev*, 2013, 113: 4611–4632
- 8 Kourist R. A new class of enzymes discovered: A non-heme oxidase produces medium-chain 1-alkenes. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 4156–4158
- 9 Winters K, Parker P L, Van Baalen C. Hydrocarbons of blue-green algae: Geochemical significance. *Science*, 1969, 163: 467–468
- 10 Schirmer A, Rude M A, Li X, et al. Microbial biosynthesis of alkanes. *Science*, 2010, 329: 559–562
- 11 Wise C E, Grant J L, Amaya J A, et al. Divergent mechanisms of iron-containing enzymes for hydrocarbon biosynthesis. *J Biol Inorg Chem*, 2017,

- 22: 221–235
- 12 Liu K, Li S. Biosynthesis of fatty acid-derived hydrocarbons: Perspectives on enzymology and enzyme engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 62: 7–14
- 13 Rude M A, Baron T S, Brubaker S, et al. Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel P450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* species. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 1718–1727
- 14 Belcher J, McLean K J, Matthews S, et al. Structure and biochemical properties of the alkene producing cytochrome P450 OleT_{JE} (CYP152L1) from the *Jeotgalicoccus* sp. 8456 bacterium. *J Biol Chem*, 2014, 289: 6535–6550
- 15 Dennig A, Kuhn M, Tassoti S, et al. Oxidative decarboxylation of short-chain fatty acids to 1-alkenes. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 8819–8822
- 16 Lee D S, Yamada A, Sugimoto H, et al. Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2003, 278: 9761–9767
- 17 Munro A W, McLean K J, Grant J L, et al. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46: 183–196
- 18 Jaroensuk J, Intasian P, Wattanasuepsin W, et al. Enzymatic reactions and pathway engineering for the production of renewable hydrocarbons. *J Biotechnol*, 2020, 309: 1–19
- 19 Sligar S G, Gunsalus I C. Proton coupling in the cytochrome P-450 spin and redox equilibria. *Biochemistry*, 1979, 18: 2290–2295
- 20 Liu Y, Wang C, Yan J, et al. Hydrogen peroxide-independent production of α -alkenes by OleT_{JE} P450 fatty acid decarboxylase. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 28
- 21 Fang B, Xu H, Liu Y, et al. Mutagenesis and redox partners analysis of the P450 fatty acid decarboxylase OleT_{JE}. *Sci Rep*, 2017, 7: 1–7
- 22 Grant J L, Hsieh C H, Makris T M. Decarboxylation of fatty acids to terminal alkenes by cytochrome P450 compound I. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 4940–4943
- 23 Faponle A S, Quesne M G, de Visser S P. Origin of the regioselective fatty-acid hydroxylation versus decarboxylation by a cytochrome P450 peroxygenase: What drives the reaction to biofuel production? *Chem Eur J*, 2016, 22: 5478–5483
- 24 Pickl M, Kurakin S, Cantú Reinhard F G, et al. Mechanistic studies of fatty acid activation by CYP152 peroxygenases reveal unexpected desaturase activity. *ACS Catal*, 2018, 9: 565–577
- 25 Shaik S S. What happens to molecules as they react? A valence bond approach to reactivity. *J Am Chem Soc*, 1981, 103: 3692–3701
- 26 Shaik S S. Valence bond all the way: From the degenerate H-exchange to cytochrome P450. *Phys Chem Chem Phys*, 2010, 12: 8706–8720
- 27 Cantú Reinhard F G, Mala A, Upadhyay P, et al. A systematic account on aromatic hydroxylation by a cytochrome P450 model compound I: A low-pressure mass spectrometry and computational study. *Chem Eur J*, 2016, 22: 18608–18619
- 28 Reinhard F G C, de Visser S P. Oxygen atom transfer using an iron(IV)-oxo embedded in a tetracyclic N-heterocyclic carbene system: How does the reactivity compare to cytochrome P450 compound I? *Chem Eur J*, 2017, 23: 2935–2944
- 29 Reinhard F G C, Lin Y T, Stańczak A, et al. Bioengineering of cytochrome P450 OleT_{JE}: How does substrate positioning affect the product distributions? *Molecules*, 2020, 25: 2675
- 30 Chowdhury A S, Ali H S, Faponle A S, et al. How external perturbations affect the chemoselectivity of substrate activation by cytochrome P450 OleT_{JE}. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, 22: 27178–27190
- 31 Rui Z, Li X, Zhu X, et al. Microbial biosynthesis of medium-chain 1-alkenes by a nonheme iron oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 18237–18242
- 32 Zhang S, Liu Y. Mechanism of fatty acid decarboxylation catalyzed by a non-heme iron oxidase (UndA): A QM/MM study. *Org Biomol Chem*, 2019, 17: 9808–9818
- 33 Manley O M, Fan R, Guo Y, et al. Oxidative decarboxylase UndA utilizes a dinuclear iron cofactor. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 8684–8688
- 34 Zhang B, Rajakovich L J, Van Cura D, et al. Substrate-triggered formation of a peroxo-Fe₂(III/III) intermediate during fatty acid decarboxylation by UndA. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 14510–14514
- 35 Acheson J F, Bailey L J, Brunold T C, et al. In-crystal reaction cycle of a toluene-bound diiron hydroxylase. *Nature*, 2017, 544: 191–195
- 36 Wang C, Zhao C, Hu L, et al. Calculated mechanism of cyanobacterial aldehyde-deformylating oxygenase: Asymmetric aldehyde activation by a symmetric diiron cofactor. *J Phys Chem Lett*, 2016, 7: 4427–4432
- 37 Lin Y T, Stańczak A, Manchev Y, et al. Can a mononuclear iron(III)-superoxo active site catalyze the decarboxylation of dodecanoic acid in UndA to produce biofuels? *Chem Eur J*, 2020, 26: 2233–2242
- 38 Timmins A, Saint-André M, de Visser S P. Understanding how prolyl-4-hydroxylase structure steers a ferryl oxidant toward scission of a strong C–H bond. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 9855–9866
- 39 Manna R N, Malakar T, Jana B, et al. Unraveling the crucial role of single active water molecule in the oxidative cleavage of aliphatic C–C bond of 2,4'-dihydroxyacetophenone catalyzed by 2,4'-dihydroxyacetophenone dioxygenase enzyme: A quantum mechanics/molecular mechanics investigation. *ACS Catal*, 2018, 8: 10043–10050

- 40 Rui Z, Harris N C, Zhu X, et al. Discovery of a family of desaturase-like enzymes for 1-alkene biosynthesis. *ACS Catal*, 2015, 5: 7091–7094
- 41 Aukema K G, Makris T M, Stoian S A, et al. Cyanobacterial aldehyde deformylase oxygenation of aldehydes yields *n*–1 aldehydes and alcohols in addition to alkanes. *ACS Catal*, 2013, 3: 2228–2238
- 42 Pandelia M E, Li N, Nørgaard H, et al. Substrate-triggered addition of dioxygen to the diferrous cofactor of aldehyde-deformylating oxygenase to form a diferric-peroxide intermediate. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 15801–15812
- 43 Rajakovich L J, Nørgaard H, Warui D M, et al. Rapid reduction of the diferric-peroxyhemiacetal intermediate in aldehyde-deformylating oxygenase by a cyanobacterial ferredoxin: Evidence for a free-radical mechanism. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 11695–11709
- 44 Warui D M, Li N, Nørgaard H, et al. Detection of formate, rather than carbon monoxide, as the stoichiometric coproduct in conversion of fatty aldehydes to alkanes by a cyanobacterial aldehyde decarbonylase. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 3316–3319
- 45 Das D, Eser B E, Han J, et al. Oxygen-independent decarbonylation of aldehydes by cyanobacterial aldehyde decarbonylase: A new reaction of diiron enzymes. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 7148–7152
- 46 Herman N A, Zhang W. Enzymes for fatty acid-based hydrocarbon biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 35: 22–28
- 47 Li N, Nørgaard H, Warui D M, et al. Conversion of fatty aldehydes to alka(e)nes and formate by a cyanobacterial aldehyde decarbonylase: Cryptic redox by an unusual dimetal oxygenase. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 6158–6161
- 48 Marsh E N G, Waugh M W. Aldehyde decarbonylases: Enigmatic enzymes of hydrocarbon biosynthesis. *ACS Catal*, 2013, 3: 2515–2521
- 49 Paul B, Das D, Ellington B, et al. Probing the mechanism of cyanobacterial aldehyde decarbonylase using a cyclopropyl aldehyde. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 5234–5237
- 50 Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, et al. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 14858–14863
- 51 de Montellano P R O, De Voss J J. Substrate oxidation by cytochrome P450 enzymes. In: De Montellano P R O, ed. *Cytochrome P450*. Boston: Springer, 2005. 183–245
- 52 Reed J R, Quilici D R, Blomquist G J, et al. Proposed mechanism for the cytochrome P450-catalyzed conversion of aldehydes to hydrocarbons in the house fly, *Musca domestica*. *Biochemistry*, 1995, 34: 16221–16227

Summary for “含铁酶催化脂肪酸脱羧制备脂肪烃的微观机理研究进展”

Research progress of the decarboxylation mechanisms of fatty acids to generate aliphatic hydrocarbons catalyzed by iron-containing enzymes

Shiqing Zhang & Yongjun Liu*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China

* Corresponding author, E-mail: yongjunliu_1@sdu.edu.cn

With the progress of human society, the consumption of energy materials is increasing in particularly the fossil fuels, which accounts for 84.7% of the total global consumption in 2018. Thus, excessive exploitation of fossil fuels not only brings about an increasingly serious energy crisis, but also leads to a series of environmental problems, such as the air quality deterioration and soil acidification, which are not conducive to the sustainable development of society. Since the 21st Annual Conference of the China Association for Science and Technology in 2019, “renewable synthetic fuels” has become one of the focuses of attention, and it also puts forward higher requirements for the research and development of renewable energy.

About 60 years ago, many plants, insects, microorganisms and microalgae were found to metabolize hydrocarbons. In 2010, Schirmer's groups recognized the alkane biosynthesis pathways of marine chlorobacteria, which aroused great interest in hydrocarbon biosynthesis. Recently, more proteases to catalyze the synthesis of hydrocarbons have been successively discovered, such as aldehyde deformylase (ADO, CYP4G and CER), fatty acid decarboxylase (UndA, UndB and OleT), polyketone synthase (Ols) and thiolytic enzyme complex system (OleABCD). In the past decades, many studies have been conducted to explore the biosynthesis of hydrocarbon, and useful information regarding the reaction mechanism has been obtained, including the kinetic rate constants and the crystal structures of the enzymes. In addition, on the basis of crystal structure, quantum chemistry method (QM) and molecular dynamics simulations (MD) were also used to explore the reaction mechanism of fatty acid decarboxylation. Since most enzymes involved in the hydrocarbon biosynthesis are iron-containing enzymes, which employ the Fe-coordinate dioxygen to trigger the reaction. In general, the whole reaction cycle contains the binding of substrates and dioxygen, and decarboxylation usually involves the hydrogen atom abstraction and breaking of C–C bond. During the reaction, complex electron transfer takes place among the Fe center, O₂ and substrate, and many factors were found to affect the catalytic activity. According to the previous experimental and theoretical studies, different enzymes show different activity and substrate scope. In general, the catalytic efficiency is still very low for most enzymes, and thus, understanding the mechanism of these catalytic reactions is undoubtedly an important basis for engineering optimization and all applications, and can also provide ideas for the design and synthesis of biomimetic catalysts.

In this paper, we review the research progress of five representative iron enzymes that catalyze the biosynthesis of aliphatic hydrocarbon, including OleT, UndA, UndB, ADO and CYP4G, and discuss the future development and application of enzyme catalysis in renewable synthetic fuels. This paper may offer some ideas and guidelines for sustainable energy supply in the future.

iron-containing enzyme, fatty acid decarboxylation, alkanes/alkenes, catalytic mechanism

doi: [10.1360/TB-2020-1482](https://doi.org/10.1360/TB-2020-1482)