

综述

生物催化剂立体选择性的基因工程改造

朱敦明, 吴洽庆

中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要: 野生型生物催化剂对于其天然底物通常具有较好的反应活性和选择性, 但生物催化剂在有机合成中应用时多数情况下是非天然底物, 这就要求对野生型生物催化剂进行改造, 以提高其对非天然底物的反应活性、稳定性和选择性(包括区域选择性和立体选择性)。以下根据酶催化剂的类型总结了近几年来通过基因工程改变生物催化剂的立体选择性的最新进展, 盼望起到抛砖引玉的作用, 以此促进我国在这一领域的快速发展。

关键词: 生物催化剂, 酶的改造, 立体选择性, 基因工程

Engineering the enantioselectivity of biocatalysts

Dunming Zhu, and Qiaqing Wu

Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Wild-type biocatalysts usually show high activity and selectivity towards their native substrates. Since non-native substrates are often used in synthetically useful biocatalytic transformations, it is necessary to engineer enzymes for improved activity, stability and selectivity (chemo-, regio- and stereoselectivity). Herein we give an overview of the recent advances in engineering the enantioselectivity of biocatalysts, with an aim to stimulate further development of this important field in China.

Keywords: biocatalyst, enzyme engineering, enantioselectivity, gene engineering

随着医药、农药及其他精细化工工业的发展, 有机合成面临着越来越大的挑战。首先, 由于生物体内的手性识别能力, 药物分子中往往只有一个立体异构体有治疗作用, 另外的立体异构体则没有治疗作用或甚至有副作用, 因此美国 FDA 在 1992 年对手性药物的批准提出了新的要求。GlaxosmithKline、AstraZeneca、Pfizer 公司的科学家对他们公司的 128 个生产工艺进行分析, 发现一半的药物化合物不仅具有手性中心, 而且平均有 2 个手性中心^[1]。2006

年美国 FDA 批准的小分子药物中, 80% 是手性化合物, 75% 是手性化合物中的单个立体异构体。可见, 精细化工工业对立体选择性有机合成技术提出了越来越高的要求。其次, 医药制品等小生产批量、高附加值的产品具有结构的复杂性和多样性, 如果生产的工艺过程具有化学和区域选择性, 则可以免除不必要的保护和去保护步骤(在传统的有机合成中通常引入保护和去保护步骤来弥补反应的化学和区域选择性的不足), 大大优化生产工艺过程, 从而降

Received: October 13, 2009; **Accepted:** October 22, 2009

Supported by: Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YWG-031), Tianjin Municipal Science & Technology Project (No. 09ZCKFSH01000).

Corresponding author: Dunming Zhu. Tel: +86-22-58218776; Fax: +86-22-58218777; E-mail: jadezhu@hotmail.com
中国科学院知识创新工程重点方向项目(No. KSCX2-YWG-031), 天津科技计划项目(No. 09ZCKFSH01000)资助。

低生产成本。第三, 由于医药、农药及其他精细化工产品的需求日益增长, 这些化工产品的品种越来越多, 生产的规模也越来越大, 对环境也就产生越来越严重的污染, 对能量的需求也产生越来越大的负担。因此, 整个精细化工产业(包括医药、农药等)的高度发展要求有机合成技术的相应发展。也就是新型的有机合成技术必须具备以下的一些特点: 高化学选择性、区域选择性和立体选择性; 反应条件温和; 反应介质及后处理对环境产生的污染少等。生物催化技术正好具有这些特点, 生物催化反应条件温和, 通常在中性和室温, 或接近这样的条件下进行; 多数情况下生物催化反应在水相中进行, 因而环境污染少; 生物催化反应通常具有高化学选择性、区域选择性和立体选择性等特点。因此, 生物催化技术在有机合成方面的应用具有非常重大的科学意义和实际应用价值。

生物催化技术在有机合成中应用的关键是发现高效的生物催化剂, 目前应用于发现新型的野生生物催化剂的方法可以分为3种: 传统的富集和筛选、基因组数据库挖掘和宏基因组的方法。虽然野生型生物催化剂对于其天然底物通常具有较好的反应活性和选择性, 但是对于非天然底物, 它们的反应活性、稳定性和选择性却常不尽人意。然而, 生物催化剂在有机合成中应用时多数情况下是非天然底物, 这就要求对野生型生物催化剂进行改造, 以提高其对非天然底物的反应活性、稳定性和选择性(包括化学选择性、区域选择性和立体选择性)。随着分子生物技术(如基因变异, 定向进化)和计算技术的日新月异, 以及对蛋白质结构和酶催化机理的了解越来越深入, 近年来这一领域得到了迅速发展^[2-6]。以下将根据酶催化剂的类型, 对近几年来通过基因工程改变生物催化剂的立体选择性的最新进展作一综述, 盼望以此促进我国在这一领域的快速发展, 从而满足我国生物化工产业发展的需要。

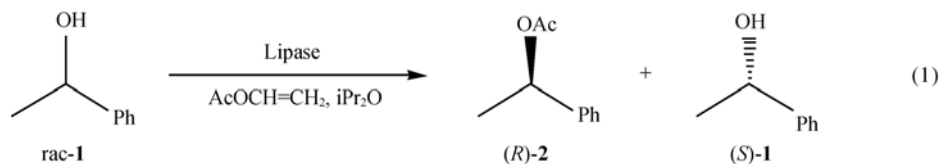
1 脂肪酶(Lipase)

脂肪酶是一类广泛应用于有机合成的水解酶, 在不同条件下可以催化酯的水解、交换和形成反应, 因此也是基因工程改造研究得最多的酶类。来源于

铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的脂肪酶催化 2-甲基癸酸对硝基苯基酯水解几乎没有立体选择性, 选择性因子 E 只有 1.1, Reetz 等经过 4 轮随机突变结合高通量筛选的方法对其进行改造, 将其催化 2-甲基癸酸对硝基苯基酯水解的立体选择性因子 E 从 1.1 提高到 11.3^[7]。在此基础上分析确定一些“热点”氨基酸残基, 并对它们进行饱和突变, 突变酶的立体选择性因子 E 达到 25.8^[8]。利用特殊的 DNA shuffling 技术, 即 combinatorial cassette mutagenesis (CMCM), 立体选择性因子 E 进一步提高到 51 以上, 该突变酶在 6 个位点发生突变, 其中只有 1 个位点在底物结合区域附近, 而其他位点都远离底物结合区域^[9]。为了揭示立体选择性提高的原因, 对这 6 个位置的氨基酸残基进行 1 个、2 个和 3 个位点的突变, 测定这些突变酶的立体选择性, 最高 E 值达到 64^[10]。进一步的理论研究表明, 立体选择性提高的主要原因是由于其中的 2 个突变(L162G 和 S53P)的协同作用, 底物结合位点附近的 L162G 扩大了底物结合空穴的体积, 可以容纳较大的 α -手性酯; 同时 S53P 引发了一个接力机制, 使得 H83 可以运动, 在以(S)-异构体作为底物时, 通过氢键作用来稳定反应过程中形成的氧负离子, 而以(R)-异构体作为底物时这种作用就不存在^[11-12]。

基于酶-底物配合物的结构模型的分析揭示, 洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia* 脂肪酶的 4 个氨基酸残基(L17、F119、L167 和 L266)位于疏水性的底物结合区域, 对这 4 个位点进行突变, 分别以(R)或(S)构型的 3-苯基丁酸对硝基苯酯为底物进行筛选, 得到 2 个突变酶(L17F/F119L/L167G/L266V/T251A 和 L17F/F119L/L167A/L266V/D21N), 选择性水解(R)构型 3-苯基丁酸对硝基苯酯($E = 33$ 或 38), 而野生酶选择性水解(S)构型底物($E = 33$)^[13]。有趣的是, 对于手性苯乙醇(1)在异丙基醚中以乙酸乙烯酯为酰化试剂的乙酰化反应(式 1), *Burkholderia cepacia* 脂肪酶的立体选择性可以通过改变 287 位的氨基酸残基来调节, 如表 1 所示^[14]。

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 脂肪酶催化(R)构型 1,2-O-异亚丙基-sn-甘油 (IPG)的乙酸、丁酸及辛酸酯优先水解, 但产物的 ee 值只在 20.3%到 73.2%之间。

表 1 *Burkholderia cepacia* 野生脂肪酶及突变酶的对映选择性Table 1 Enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase and mutants

Entry	Lipase	Time (h)	Conversion ^a (%)	TTN ^b	ee(%)		E ^c
					(R)-2	(S)-1	
1	Wild-type	4.5	0.473	7800	94.1	84.4	88
2	I287F	7.0	0.457	7500	96.8	81.5	156
3	I287L	9.0	0.438	7200	95.8	74.6	105
4	I287M	3.5	0.484	8000	88.4	82.8	42
5	I287A	12.5	0.491	8100	52.6	50.8	5

a: conversion calculated from $c = ee(1)/(ee(1) + ee(2))$; b: TTN is the total number of moles of the product formed per mole of the enzyme. Calculated from $TTN = 0.5 \times c \times 33\ 000$ (molecular weight of the lipase); c: calculated from $E = \ln[1-c(1+ee(2))]/\ln[1-c(1-ee(2))]$.

对 16~20 位点的氨基酸残基进行饱和突变, 采用噬菌体展示的方法筛选突变库, 得到了具有相反映倾向性的突变酶(N18I), 优先催化(S)构型 IPG 的乙酸、丁酸及辛酸酯的水解^[15]。

2-卤代羧酸是一类重要的手性中间体, 广泛应用于药物合成, 来源于耶罗维亚酵母 *Yarrowia lipolytica* 的脂肪酶可以催化 2-卤代芳香乙酸酯的拆分, 例如该酶优先催化(S)-2-溴代苯乙酸酯与正辛醇的酯交换反应, 选择性因子 E 达 50, 但是立体选择性远未能满足工业应用的需要。以米黑根毛霉 *Rhizomucor miehei* 和绵毛嗜热丝孢菌 *Thermomyces lanuginosa* 脂肪酶的晶体结构为模板, 采用同源模拟的方法构建 *Yarrowia lipolytica* 脂肪酶的三维结构模型, 发现 5 个氨基酸残基(T88、V94、D97、V232 和 V285)构成疏水性的底物结合部位。对这些位点的定点突变揭示 232 位氨基酸对该酶的立体选择性起着非常重要的作用, V232S 突变酶高立体选择性地催化(S)-2-溴代苯乙酸辛酯和(S)-2-溴代(邻甲苯基)乙酸辛酯水解, E 值高达 200 以上^[16]。V232A 突变酶催化 2-溴代苯乙酸酯立体选择性水解, E 值为 59, 比野生酶(E = 5.5)提高 1 个数量级; 催化 2-溴代(邻甲苯基)乙酸酯水解的立体选择性 E 值高达 111, 是野生酶(E = 27)的 4 倍^[17]。

2 酯酶(Esterase)

与脂肪酶相似, 对荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 酯酶进行随机突变, 以 3-溴-2-甲基丙酸

甲酯和 3-苯基丁酸乙酯为底物, 筛选得到一些立体选择性有所提高(E 值的提高小于 1 倍)的突变酶, 这些变异酶的突变位点都在活性中心的外面, 离底物 12 Å 至 14 Å^[18]。然而, 对 *Pseudomonas fluorescens* 酯酶的底物结合区域(W28、V121、F198 和 V225)进行突变, 突变酶 V121S 和 W28L 催化 3-溴-2-甲基丙酸甲酯水解的对映选择性因子 E 从野生酶的 12 分别提高到 61 和 58, 表明对酶的底物结合区域的突变比对整个酶进行随机突变更为有效^[19]。最近 Bornscheuer 研究组建立了一种新的高通量筛选方法, 当以 2-羟基丁酸的乙酸酯为底物, 水解反应释放的乙酸通过偶联的酶反应转变成柠檬酸, 同时产生 NADH, 这样可以通过测量 NADH 在 340 nm 的吸收来快速测定水解反应的速度。他们采用此法得到了若干高立体选择性的酯酶, E 值达到 96^[20-21]。

来源于唐菖蒲伯克霍尔德菌 *Burkholderia gladioli* 的酯酶催化 3-羟基异丁酸甲酯的水解拆分, 具有中等程度的(S)-对映选择性, 活性中心附近的 152 位点的饱和突变发现, 该位点的氨基酸的变化可以改变 *Burkholderia gladioli* 酯酶的立体选择性, 甚至有的突变酶的对映倾向性从(S)反转到(R)。对 135、253 和 351 三个氨基酸残基的突变, 可以进一步提高其(R)-对映选择性^[22]。

脂肪酶和酯酶广泛应用于 2°醇的拆分, 但应用于 3°醇的拆分则不多, 因为对于 3°醇它们常表现出较低的催化活性和立体选择性, 例如, *Bacillus subtilis* 酯酶催化 3-苯基-3-羟基丁酸的乙酸酯的水解

拆分, E 值小于 3。基于分子模拟, 发现了 2 个高立体选择性的突变酶。对于 3-苯基-3-羟基丁炔的乙酸酯的水解拆分, G105A 的对映选择性 E 值增加到 56; E188D 和 G105A 催化其三氟甲基类似物的水解拆分的对映选择性 E 值达到 100 以上, 生成 >99% ee 值的 (*S*) 构型的醇^[23-25]。基于具有高度同源性的 BsubpNBE 酯酶的晶体结构分析, 3 个相邻的指向活性中心的氨基酸残基(E188、A190 和 M193)被选为突变位点, 对突变库进行筛选得到一个具有相反对映倾向性的突变酶(E188W/M193C)^[26]。

3 环氧化物水解酶(Epoxide hydrolase)

环氧化物水解酶催化环氧化物水解生成邻二醇, 可应用于合成光学纯的环氧化物和二醇化合物。例如, 来源于发根农杆菌 *Agrobacterium radiobacter* AD1 的环氧化物水解酶催化芳香环氧化物的水解反应只具有中等水平的立体选择性, 晶体结构和定点突变研究表明 D107、H275 和 D246 是其 3 个催化位点, Y215 和 Y152 苯环上的羟基指向底物环氧化物的氧原子, 对形成反应中间体的过渡态起着稳定的作用。将 215 位的酪氨酸突变成苯丙氨酸, 催化芳香环氧化物水解反应的立体选择性提高了 2~3 倍, 分别以 (*R*) 或 (*S*) 构型芳香环氧化物为底物进行的动力学分析表明, 立体选择性的提高主要由于 Y215F 突变酶催化 (*S*) 构型芳香环氧化物水解的速度显著降低^[27]。108 位点的苯丙氨酸位于亲核的天冬氨酸的侧面, 构成底物结合部位的一部分, 对该位点进行饱和和突变形成一个突变库, 以对硝基酚氧基环氧丙烷为底物进行筛选, 得到 5 个突变酶, 它们的立体选择性提高 3~7 倍; 一些突变酶还可以催化内消旋环氧化物的水解生成单一立体构型的二醇产物。例如 F108C 突变酶催化顺式 2, 3-环氧丁烷水解生成的 (2*R*, 3*R*)-2, 3-丁二醇的 ee 值大于 99%, 反应活性提高 7 倍; F108A 突变酶催化环氧化环己烷水解生成 (1*R*, 2*R*)-1, 2-环己烷二醇 (大于 99% ee), 反应活性提高 150 倍以上^[28]。

来源于黑曲霉 *Aspergillus niger* 的环氧化物水解酶催化酚氧基环氧丙烷的动力学拆分, 但是立体选择性低 ($E = 4.6$)。Reetz 等采用 epPCR 的方法对该酶

进行改造, 通过高通量筛选得到了一个突变酶, 其立体选择性比野生酶提高了 2 倍多, 该突变酶具有 3 个氨基酸残基发生突变, 并有 2 个位于距离催化中心较远的位置^[29]。近来同一研究小组对该酶的底物结合部位采用重复 CASTing 的方法进行多轮的优化改造, 得到一系列立体选择性显著提高的突变酶, 其中 LW202 (L215F、A217N、R219S、L249Y、T317W、T318V、M329P、L330Y、C350V) 的立体选择性 E 值达到 115, 远高于野生酶。晶体结构研究表明野生酶和突变酶 LW202 的整体结构几乎一致, 但是底物结合部位的结构则有较大的区别, 分子力学计算和分子模拟研究揭示 (*S*) 构型的酚氧基环氧丙烷在底物结合部位的取向有利于开环水解反应的发生, 而 (*R*) 构型的酚氧基环氧丙烷处于不利于水解的取向, 这与高选择性水解 (*S*) 构型的酚氧基环氧丙烷的实验结果一致^[30-32]。

4 羰基还原酶(Carbonyl reductase)

羰基还原酶催化羰基化合物的还原生成手性醇, 一类重要的高价值手性化合物。笔者系统地研究了来源于赭色掷孢酵母 *Sporobolomyces salmonicolor* 的羰基还原酶(SSCR)的催化性质, 发现此酶具有非常宽广的底物范围, 包括脂肪酮、芳香酮、 α -和 β -羰基酯等, 其中很多底物都被高立体选择性地还原成相应的光学纯的手性醇。但是 SSCR 催化对位取代的苯乙酮的立体选择性不高, ee 值低于 59%^[33-34]。酶-底物嵌合和分子模拟研究发现对位取代的苯乙酮在底物结合部位可以采取两种能量较接近的取向 (图 1), 从辅酶 NADPH 向羰基的氢转移分别导致 (*S*) 和 (*R*) 构型的苯乙醇的生成, 同时发现对位取代苯乙酮的对位取代基与 SSCR 的 Q245 和 M242 位的氨基酸的侧基具有较强的相互作用, 因此推断 Q245 和 M242 位的氨基酸可能对该酶的立体选择性具有重要的作用。因此笔者首先对 Q245 进行饱和突变, 以对甲氧基苯乙酮为底物进行筛选, 意外地得到 3 个突变酶(Q245H、Q245P 和 Q245L), 它们催化对位取代苯乙酮还原生成的主要产物是 (*S*) 构型的苯乙醇, 与以野生酶 SSCR 作为催化剂得到的主要产物的构型相反, 而且反应的立体选择性大幅度提高, ee 值

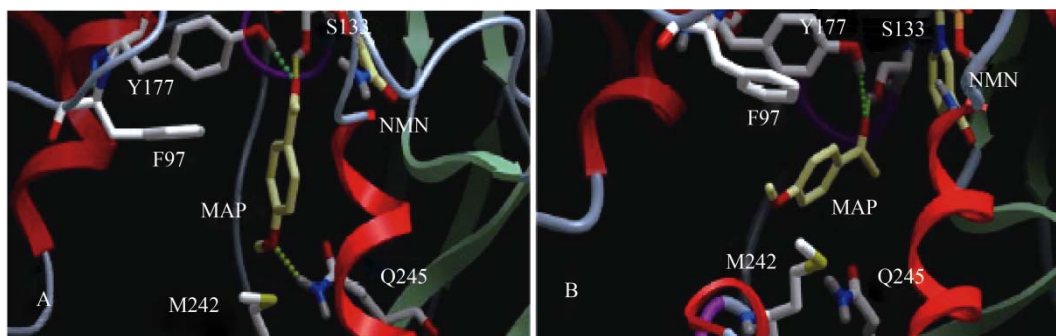


图1 对甲氧基苯乙酮在SSCR底物结合部位采取两种能量较接近的取向

Fig. 1 Substrate 4'-methoxyacetophenone docked into the active site of SSCR. Two energetically close docking conformations with leading to (*S*)-enantiomer (A) and forming (*R*)-enantiomer (B).

表2 SSCR 和其突变酶催化对位取代苯乙酮还原产物的 ee 值和绝对构型

Table 2 The ee values and absolute configurations of the reduction product alcohols of *para*-substituted acetophenones catalyzed by SSCR and its Q245 mutants

R	SSCR-WT	Q245H	Q245P	Q245L
4'-H	42 (R)	78 (S)	64 (S)	82 (S)
4'-F	46 (R)	92 (S)	90 (S)	93 (S)
4'-Cl	14 (R)	90 (S)	96 (S)	96 (S)
4'-Br	42 (R)	92 (S)	98 (S)	97 (S)
4'-CH ₃	59 (R)	95 (S)	96 (S)	95 (S)
4'-OCH ₃	57 (R)	79 (S)	98 (S)	96 (S)
4'-C(CH ₃) ₃	31 (R)	96 (S)	99 (S)	99 (S)
4'-CF ₃	17 (S)	96 (S)	98 (S)	93 (S)

几乎都大于 90%(表 2)。对 M242 的饱和突变得到 4 个突变酶, 它们催化对位取代苯乙酮还原时也有利于(*S*)构型的苯乙醇的生成, 但效果没有 Q245 突变酶明显。对 Q245 和 M242 进行双饱和突变, 筛选得到 2 个突变酶, 它们催化对位取代苯乙酮还原生成的(*S*)构型对位取代苯乙醇的 ee 值都大于 92%。由此可见, 245 和 242 位的氨基酸对该酶的立体选择性具有非常重要的作用, Q245 的作用更为显著^[35]。

来源于嗜热厌氧乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的 2°醇脱氢酶(TeSADH)遵循 Prelog 规则, 催化羰基化合物还原生成(*S*)构型手性醇。布氏热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacter brockii* 醇脱氢酶(TbSADH)的晶体结构结合分子模拟研究表明这类醇脱氢酶的底物结合部位由 2 个不同大小的空穴组成, 并决定了其立体选择性。最近 Musa 等将 86 位的异亮氨酸变成丙氨酸, 从而扩大了其中较小空穴

的体积, 使其可以容纳较大的基团, I86A 突变酶催化苯乙酮类化合物的还原生成(*R*)构型的手性醇产物^[36]。江南大学的徐岩研究组对来源于近平滑假丝酵母 *Candida parapsilosis* 的羰基还原酶的 67、68 和 69 三个位点进行突变, 得到的突变酶也改变了其催化 2-羟基苯乙酮还原的立体倾向性, 生成的主要产物由(*S*)构型变成了(*R*)-构型, 其中 S67D/H68D 催化 2-羟基苯乙酮还原的 ee 值达到 95%以上^[37]。

5 氧化酶(Monooxygenase)

Baeyer Villiger 单氧化酶催化酮的氧化反应生成酯或内酯, 常以作用的底物来命名, 如环己酮单氧化酶(CHMO)、环戊酮单氧化酶(CPHO)等, 可应用于手性酮的拆分或前手性酮的去对称性反应。与其他的酶催化反应一样, 立体选择性不是总能满足实际要求, 因此需要对其进行改造。例如, 来源于不动杆菌属 *Acinetobacter* sp.的环己酮单氧化酶催化 4-羟基环己酮的氧化生成内酯, 然后重排成产物(3), 主要产物是(*R*)-构型, 但 ee 值只有 9%(图 2)。Reetz 等采用 epPCR 的方法对该酶进行改造, 通过高通量筛选得到了一系列突变酶, 不仅提高了产物的 ee 值, 而且有的突变酶催化氧化的主要产物是(*S*)-构型, 经过 2 轮突变、筛选, 得到了一个突变酶, 其催化 4-羟基环己酮氧化产物的 ee 值达到 90%(图 2)^[38-39]。环己酮单氧化酶也催化硫醚的不对称氧化生成手性亚砜, 以对甲苯基甲基硫醚为底物筛选以上的环己酮单氧化酶突变库, 得到 5 个突变酶, 其中 2 个催化对甲苯基甲基硫醚氧化生成(*R*)-构型亚砜, 另外 3 个催化氧化的产物是(*S*)-构型亚砜, ee 值都在 95%以上^[40]。

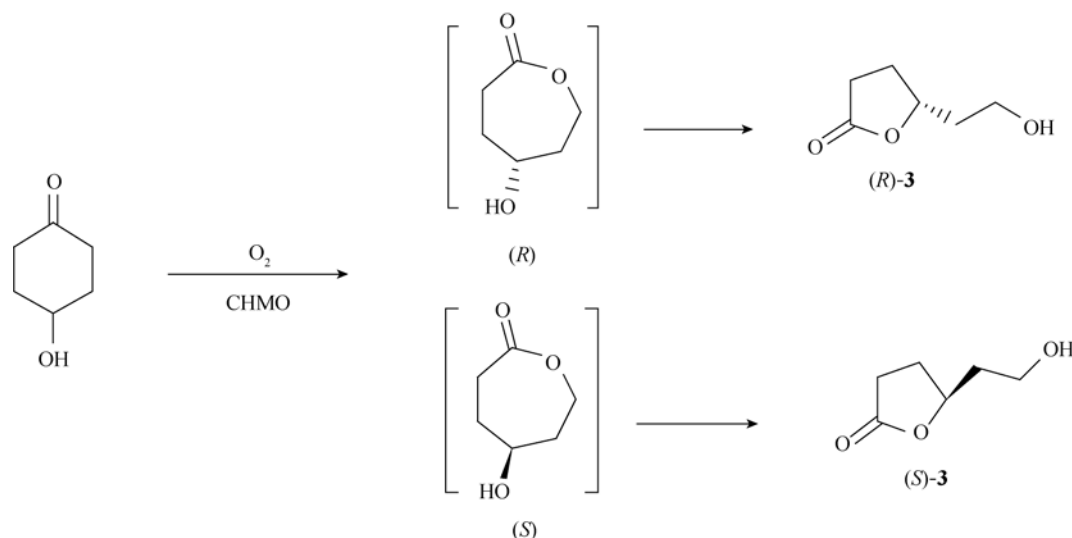


图2 环己酮单氧化酶催化4-羟基环己酮的Baeyer-Villiger氧化反应

Fig. 2 Cyclohexanone monooxygenase catalyzed Baeyer-Villiger oxidation of 4-hydroxycyclohexanone.

通过对上述环己酮单氧化酶改造的结果和苯基丙酮单氧化酶的晶体结构的分析,以及环戊酮单氧化酶的蛋白质序列与它们的序列进行比照,获得了环戊酮单氧化酶的潜在活性中心的氨基酸信息,从而对这些部位进行突变,结合筛选,得到的突变酶可以催化4-取代环己酮的去对称性氧化生成高光学纯的内酯产物^[41-42]。研究表明对苯基丙酮单氧化酶的底物结合部位附近的4个氨基酸残基进行突变,也显著地改变其立体选择性^[43]。定向进化也用来提高来源于荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 的Baeyer-Villiger 单氧化酶的立体选择性^[44]。

6 脱羧酶(Decarboxylase)

芳香丙二酸脱羧酶催化 α -芳香- α -甲基丙二酸脱羧生成光学活性的(R)-构型 α -芳香基丙酸,化学和光学产率通常都较高。机理研究发现活性部位的C188在反应中起着重要作用,位于烯酯中间体的 si -面,作为氢原子供体把氢转移给烯酯中间体,形成(R)-构型 α -芳香基丙酸。与芳香丙二酸脱羧酶有一定同源性的谷氨酸异构酶、天冬氨酸异构酶具有类似的氢转移机制,但在烯酯中间体的两侧各有一个C氨基酸残基,因而氢转移可以发生在烯酯中间体的两侧,导致异构化反应的发生。Terao等推测将芳香丙二酸脱羧酶中关键的C残基换到烯酯中间体的

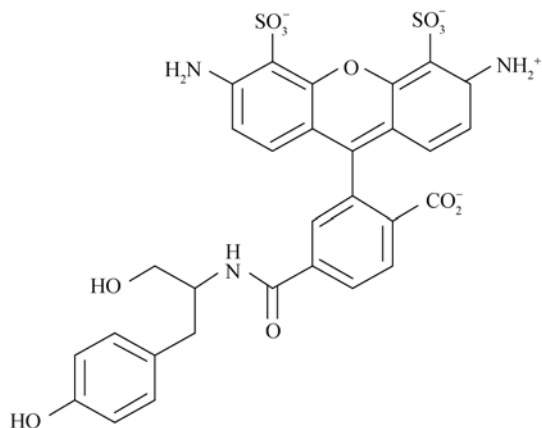
re -面会反转其脱羧产物的立体构型,他们将位于烯酯中间体的 re -面的G74周围的氨基酸残基突变成C,结果发现突变酶S71C/C188S和G74C/C188S确实具有脱羧酶活性,生成(S)-构型 α -芳香基丙酸^[45-46]。

7 过氧化物酶(Peroxidase)

辣根过氧化物酶催化过氧化氢氧化酚类化合物的反应,但是反应的立体选择性较低。最近对辣根过氧化物酶进行随机突变,采用一种应用 yeast surface display 和 fluorescence activated cell sorting (FACS) 的筛选方法得到若干具有较高立体选择性的突变辣根过氧化物酶,其中R178Q/N158D突变酶催化化合物(4)氧化的立体选择性E达到49,远高于野生酶(E=1.6)(图3)^[47]。对辣根过氧化物酶的178位点的19种突变酶催化化合物(4)氧化的立体选择性的研究发现R178E具有最高的立体选择性,E值是野生酶的25倍^[48]。

8 总结与展望

近十多年来,生物催化剂的立体选择性的基因工程改造取得了可喜的进展。不需要了解酶的结构和反应机理,就可以采取随机突变结合高通量筛选的策略来提高酶催化剂的立体选择性;如果对酶的结构和反应机理有所理解,则可以通过分子模拟等方法分析预测对立体选择性影响可能较大的位点,

图3 化合物(4)的结构^[47]Fig. 3 Structure of compound (4)^[47].

并对这些位点进行突变, 建立较小的突变库, 然后筛选得到所需要的突变酶。由于远离活性中心的氨基酸残基的数量比位于活性中心的氨基酸残基多得多, 所以定向进化往往得到突变位点远离活性中心的突变酶; 而对底物结合区域的氨基酸残基的突变, 改变酶的立体选择性的效果更为明显, 有时一个位点的变异就可以显著提高酶的立体选择性, 甚至反转酶的对映倾向性。生物催化剂的基因工程改造的关键是建立有效的筛选方法, 对于水解酶类催化剂, 可以采用光学纯的(S)和(R)构型的化合物作为底物建立快速的高通量筛选方法; 而对羧基还原酶催化的还原反应等, 建立快速的高通量筛选方法还是具有很大挑战性的。建立在与(R)-选择性醇氧化酶偶合基础上的快速测定羧基还原酶催化反应产物的 ee 值的方法见诸报道^[49], 但其广泛应用还受到高立体选择性醇氧化酶的限制。因此, 理性分析选择改造位点, 定点突变建立高效的突变库, 然后筛选获得高活性、高立体选择性的生物催化剂, 将继续是未来的发展重点, 精细化工行业对生物催化技术的重视和需求将推动该领域的快速发展。

REFERENCES

- [1] Carey JS, Laffan D, Thomson C, *et al.* Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org Biomol Chem*, 2006, **4**(12): 2337–2447.
- [2] Turner NJ. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nature Chem Biol*, 2009, **5**(8): 567–573.
- [3] Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. Finding better protein engineering strategies. *Nature Chem Biol*, 2009, **5**(8): 526–529.
- [4] Toscano MD, Woycechowsky KJ, Hilvert D. Minimalist active-site redesign: teaching old enzymes new tricks. *Angew Chem Int Ed*, 2007, **46**: 3212–3236.
- [5] Marti S, Andres J, Moliner V, *et al.* Computational design of biological catalysts. *Chem Soc Rev*, 2008, **37**: 2634–2643.
- [6] Tracewell CA, Arnold FH. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, **13**: 3–9.
- [7] Reetz MT, Zonta A, Schimossek K, *et al.* Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by *in vitro* evolution. *Angew Chem Int Ed*, 1997, **36**(24): 2830–2832.
- [8] Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, *et al.* Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol*, 2000, **7**(9): 709–718.
- [9] Reetz MT, Wilensek S, Zha D, *et al.* Directed evolution of an enantioselective enzyme through combinatorial multiple-cassette mutagenesis. *Angew Chem Int Ed*, 2001, **40**(19): 3589–3591.
- [10] Reetz MT, Puls M, Carballeira JD, *et al.* Learning from directed evolution: further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem*, 2007, **8**: 106–112.
- [11] Reetz MT. Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(16): 5716–5722.
- [12] Bocola M, Otte N, Jaeger KE, *et al.* Learning from directed evolution: theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem*, 2004, **5**: 214–223.
- [13] Koga Y, Kato K, Nakano H, *et al.* Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and *in vitro* expression. *J Mol Biol*, 2003, **331**: 585–592.
- [14] Ema T, Fujii T, Ozaki M, *et al.* Rational control of enantioselectivity of lipase by site-directed mutagenesis based on the mechanism. *Chem Commun*, 2005, 4650–4651.
- [15] Droge MJ, Boersma YL, van Pouderooyen G, *et al.* Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and phage display selection. *ChemBioChem*, 2006, **7**: 149–157.
- [16] Bordes F, Cambon E, Dossat-Letisse V, *et al.* Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *ChemBioChem*, 2009, **10**: 1705–1713.
- [17] Cancino M, Bauchart P, Sandoval G, *et al.* A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic

- acid esters. *Tetrah: Asym*, 2008, **19**: 1608–1612.
- [18] Horsman GP, Liu AMF, Henke E, *et al.* Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl 3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl 3-phenylbutyrate. *Chem Eur J*, 2003, **9**: 1933–1939.
- [19] Park S, Morley KL, Horman GP, *et al.* Focusing mutations into the *P. fluorescens* esterase binding site increases enantioselectivity more effectively than distant mutations. *Chem Biol*, 2005, **12**: 45–54.
- [20] Bottcher D, Bornscheuer UT. High-throughput screening of activity and enantioselectivity of esterases. *Nature Protocol*, 2006, **1**(5): 2340–2343.
- [21] Schmidt M, Hasenpush D, Kahler, M, *et al.* Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *ChemBioChem*, 2006, **7**: 805–809.
- [22] Ivancic M, Valinger G, Gruber K, *et al.* Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. *J Biotechnol*, 2007, **129**(1), 109–122.
- [23] Henke E, Bornscheuer UT, Schmid RD, *et al.* A molecular mechanism of enantioselective recognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *ChemBioChem*, 2003, **4**: 485–493.
- [24] Heinzel B, Kouristl R, Fransson L, *et al.* Highly enantioselective kinetic resolution of two tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. *Protein Eng Des Sel*, 2007, **20**(3): 125–131.
- [25] Kourist R, Bartsch S, Bornscheuer UT. Highly enantioselective synthesis of arylaliphatic tertiary alcohols using mutants of an esterase from *Bacillus subtilis*. *Adv Synth Catal*, 2007, **349**: 1393–1398.
- [26] Bartsch S, Kourist R, Bornscheuer UT. Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew Chem Int Ed*, 2008, **47**: 1508–1511.
- [27] Spelberg JHL, Rink R, Archelas A, *et al.* Biocatalytic potential of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 and a mutant with enhanced enantioselectivity. *Adv Synth Catal*, 2002, **334**(9): 980–985.
- [28] van Loo B, Kingma J, Heyman G, *et al.* Improved enantioselective conversion of styrene epoxides and meso-epoxides through epoxide hydrolases with a mutated nucleophile-flanking residue. *Enz Microb Technol*, 2009, **44**(3): 145–153.
- [29] Reetz MT, Torre C, Eipper A, *et al.* Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by directed evolution. *Org Lett*, 2004, **6**(2): 177–180.
- [30] Reetz MT, Wang LW, Bocola M. Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angew Chem Int Ed*, 2006, **45**: 1236–1241.
- [31] Reetz MT, Sanchis J. Constructing and analyzing the fitness landscape of an experimental evolutionary process. *ChemBioChem*, 2008, **9**: 2260–2267.
- [32] Reetz MT, Bocola M, Wang LW, *et al.* Directed evolution of an enantioselective epoxide hydrolase: uncovering the source of enantioselectivity at each evolutionary stage. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(21): 7334–7343.
- [33] Zhu D, Yang Y, Buynak JD, *et al.* Stereoselective ketone reduction by a carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor*. Substrate specificity, enantioselectivity, and enzyme-substrate docking studies. *Org Biomol Chem*, 2006, **4**: 2690–2695.
- [34] Zhu D, Hua L. Enantioselective enzymatic reduction of sterically bulky aryl alkyl ketones catalyzed by a NADPH-dependent carbonyl reductase". *J Org Chem*, 2006, **71**: 9484–9486.
- [35] Zhu D, Yang Y, Majkowitz S, *et al.* Inverting the enantioselectivity of a carbonyl reductase via enzyme-substrate docking-guided point mutation". *Org Lett*, 2008, **10**: 525–528.
- [36] Musa MM, Lott N, Laivenieks M, *et al.* A single point mutation reverses the enantiopreference of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase. *Chem Cat Chem*, 2009, **1**: 89–93.
- [37] Zhang R, Xu Y, Sun Y, *et al.* Ser67Asp and His68Asp substitutions in *Candida parapsilosis* carbonyl reductase alter the coenzyme specificity and enantioselectivity of ketone reduction. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(7): 2176–2183.
- [38] Reetz MT, Brunner B, Schneider T, *et al.* Directed evolution as a method to create enantioselective cyclohexanone monooxygenases for catalysis in Baeyer-Villiger reactions. *Angew Chem Int Ed*, 2004, **43**: 4075–4078.
- [39] Kayser MM, Clouthier CM. New Bioorganic reagents: evolved cyclohexanone monooxygenases-why is it more selective? *J Org Chem*, 2006, **71**(22): 8424–8430.
- [40] Reetz MT, Daligault F, Brunner B, *et al.* Directed evolution of cyclohexanone monooxygenases: enantioselective biocatalysts for the oxidation of prochiral thioethers. *Angew Chem Int Ed*, 2004, **43**: 4078–4081.
- [41] Clouthier CM, Kayser MM, Reetz MT. Designing new Baeyer-Villiger monooxygenases using restricted CASTing. *J Org Chem*, 2006, **71**(22): 8431–8437.
- [42] Clouthier CM, Kayser MM. Increasing the enantioselectivity of cyclopentanone monooxygenase (CPMO): profile of new CPMO mutants. *Tetrahedron*, 2006, **17**: 2649–2653.
- [43] Reetz MT, Wu S. Greatly reduced amino acid alphabets in directed evolution: making the right choice for saturation mutagenesis at homologous enzyme positions. *Chem Commun*, 2008, 5499–5501.
- [44] Kirshner A, Bornscheuer UT. Directed evolution of a Baeyer-Villiger monooxygenase to enhance enantioselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **81**: 465–472.
- [45] Ijima Y, Matoishi K, Terao Y. Inversion of enantioselectivity

of asymmetric biocatalytic decarboxylation by site-directed mutagenesis based on the reaction mechanism. *Chem Commun*, 2005, 877–879.

- [46] Terao Y, Ijima Y, Miyamoto K, *et al.* Inversion of enantioselectivity of arylmalonate decarboxylase via site-directed mutation based on the proposed reaction mechanism. *J Mol Catal B: Enzym*, 2007, **45**: 15–20.

- [47] Antipov E, Cho AE, Wittrupa KD, *et al.* Highly L and D enantioselective variants of horseradish peroxidase

discovered by an ultrahigh-throughput selection method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(46): 17694–17699.

- [48] Antipov E, Cho AE, Klivanov AM. How a single-point mutation in horseradish peroxidase markedly enhances enantioselectivity. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(31): 11155–11160.

- [49] Truppo MD, Escalettes S, Turner NJ. Rapid determination of both the activity and enantioselectivity of ketoreductases. *Angew Chem Int Ed*, 2008, **47**: 2639–2641.



快 讯

《《自然》百年科学经典》在京首发

全球迄今最大规模的《自然》杂志论文选集——《自然 百年科学经典》12月3日上午在中国科学院国家科学图书馆举行首发式。全国人大常委会副委员长、中国科学院院长路甬祥，新闻出版总署副署长邬书林，《自然》主编菲利普·坎贝尔，麦克米伦出版（中国）有限公司出版董事朗礼，丛书的中方编委中国科学院院士许智宏、赵忠贤、滕吉文以及审稿专家、译者等 200 余人参加了首发式。

英汉双语对照版《自然 百年科学经典》(Nature: the Living Record of Science)是由外语教学与研究出版社联合麦克米伦出版集团和自然出版集团共同策划编辑的科学主题丛书。丛书共 10 卷，收录并翻译了《自然》杂志自 1869 年创刊以来近 150 年间发表过的 840 余篇经典文献。此次发布的是这套丛书的前两卷，其余 8 卷预计于 2010 年陆续出版。

该丛书所选文章涵盖物理、化学、天文、地理和生物等基础学科及众多交叉学科，从狭义相对论的提出到量子理论的日趋成熟，从同位素的发现到纳米管的诞生，从进化论之争到人类基因组测序完成……再现了一个多世纪以来人类在自然科学领域艰辛跋涉、不断探索的历史足迹，堪称一部鲜活的近代科学史诗。

据悉，该套《自然 百年科学经典》是国内第一部以英汉双语对照形式出版的《自然》杂志经典论文选集，收录了《自然》杂志自 1869 年创刊以来最具开创意义、最具影响力的经典科学文献，其中大部分是原创性的科研论文，也有少量综述、新闻快报和通讯评论等。此外，丛书的编者对每篇文章都精心撰写了简短导读，帮助读者快速了解全文大意。



路甬祥和邬书林为《《自然》百年科学经典》首发揭幕