



国外优秀科技著作出版专项基金资助

工业生物技术 译著系列

生物催化在制药工业的应用 ——发现、开发与生产

Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry

—— Discovery, Development, and Manufacturing

[美] 陶军华 (Junhua Tao)

林国强 (Guo-Qiang Lin)

编著

[德] 安德列亚斯·李斯 (Andreas Liese)

许建和 陶军华 林国强 主译

郁惠蕾 许建和 译校



化学工业出版社



国外优秀科技著作出版专项基金资助

工业生物技术 译著系列

生物催化在制药工业的应用 ——发现、开发与生产

Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry

—— Discovery, Development, and Manufacturing

[美] 陶军华 (Junhua Tao)

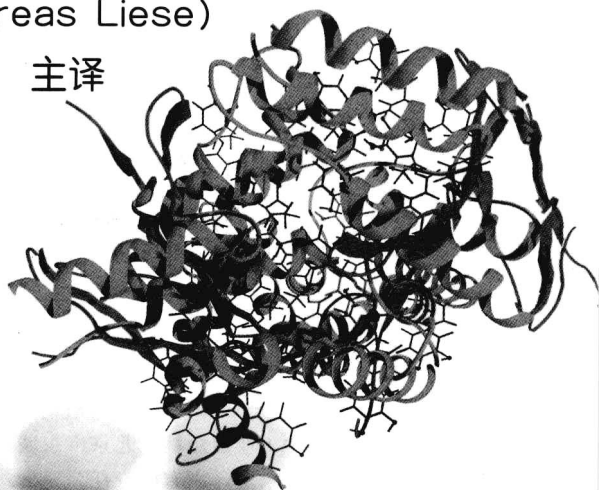
林国强 (Guo-Qiang Lin)

编著

[德] 安德列亚斯·李斯 (Andreas Liese)

许建和 陶军华 林国强 主译

郁惠蕾 许建和 译校



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物催化在制药工业的应用——发现、开发与生产/
[美] 陶军华, 林国强, [德] 李斯编著; 许建和,
陶军华, 林国强主译. —北京: 化学工业出版社,
2010. 7

(工业生物技术译著系列)

书名原文: Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry—Discovery, Development, and Manufacturing
ISBN 978-7-122-08810-9

I. 生… II. ①陶…②林…③李…④许… III. 生物-
催化-应用-制药工业-研究 IV. TQ46

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 107812 号

Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry—Discovery, Development, and
Manufacturing by Junhua Tao, Guo-Qiang Lin, Andreas Liese
ISBN 978-0-470-82314-9 (HB)

Copyright © 2009 by John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd. All rights reserved.
Authorized translation from the English language edition published by John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd

本书中文简体字版由 Junhua Tao, Guo-Qiang Lin, Andreas Liese 授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分, 违者必究。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2010-3833

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 周 倜

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 张 辉

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市前程装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 20¼ 彩插 1 字数 400 千字 2010 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

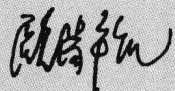
定 价: 50.00 元

版权所有 违者必究

“工业生物技术译著系列”前言

生物技术在 20 世纪 80 年代与 90 年代分别为生物医药与农业带来了革命性的飞跃。以生物催化与生物转化为主要内容的工业生物技术，被视为生物技术的第三次重大应用，已成为发达国家的重要科技与产业发展战略。我国在政府和同行专家的大力支持下于 2003 年批准了第一个生物催化和生物转化的国家 973 项目。在该 973 项目的组织过程中，我们首先注意到了一本由德国几位著名专家编写的“industrial biotransformations”。该书是迄今为止世界上第一部汇集工业生物转化过程的权威著作。因此，着手翻译了这本书，以供 973 项目组内部使用，并在化学工业出版社的建议和支持下于 2005 年 8 月公开出版该书。在此期间，我们又陆续看到国外出版的一些非常好的工业生物技术图书（主要是 Wiley 出版社），逐步产生了做一个“工业生物技术译著系列”的想法，以介绍国外该领域的工作经验和最新进展，为我国的工业生物技术的发展做些贡献。

“工业生物技术译著系列”得到了杨胜利院士和同行们的大力支持。该系列丛书由化学工业出版社出版。我们非常欢迎国内外同行推荐该领域的好书。原版书出版社不限于 Wiley。原则上，选择这些书的条件是：内容符合工业生物技术、水平较高、互相之间没有太多重叠、有较宽泛的读者群。



2005 年 8 月 28 日

译者前言

生物催化与生物转化是人类赖以生存的生态系统将太阳辐射的巨大能量加以固化与储存的有效手段，是地球上一切生物质循环转化的本质特征，也是人类从石油文明向“低碳经济”过渡的最佳途径。生物催化与生物转化已经作为新一代工业生物技术的主体，写入国家的中长期科技规划（2006—2020），并得到 973 计划和 863 计划的大力支持。

药用化合物一般是与人体内的酶、蛋白质或其他功能性生物大分子发生特异性相互作用的活性小分子。因此，在药物分子的制造过程中引入酶作为催化剂也就不难理解。然而，要将自然界普遍存在的生物催化过程转化为高效的工业生产过程，不仅取决于技术上能否发现与目标分子（多数为人工合成的非天然化合物）有效结合并发生催化作用的酶，而且取决于经济上生物催化过程相对于其他工艺路线（例如化学合成或微生物发酵）的竞争优势。因此，相对而言生产规模较小、纯度要求较高的药物生产便自然而然地成为生物催化技术产业化应用的首选目标。但是，如何发现、开发奇妙的生物催化过程，并将它与市场巨大、前景诱人而生产过程相对比较复杂和困难的制药产业有机结合在一起，正是陶军华、林国强和安德列亚斯·李斯（Andreas Liese）邀请国际学术界和产业界的知名学者所撰写的这本著作试图展示给广大读者的最新答案，也是本书译者为了国内读者的阅读方便及经济实惠而出版中译本的主要原因。希望本书能成为生物化工和制药工程等相关专业本科生和研究生的教学参考书，同时也希望它作为生物、医药以及相关行业科技工作者的工具书，为我国医药生物技术产业的发展壮大贡献一份力量。

本书由华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室许建和教授，联合原著编著者陶军华博士（现杭州师范大学特聘教授）和林国强院士（中科院上海有机化学研究所研究员）主持翻译，华东理工大学生物催化研究室郁惠蕾博士、潘江讲师、李春秀博士、马宏敏博士以及张杰博士率领众多在读的硕士、博士研究生共同完成。参加本书初译和初校的研究生同学有：李爱涛、郑高伟、倪燕、张志钧、陈兵、钱乐、董青、鞠鑫、刘俊峰、石乾乾、李云龙、许国超、田昕、王丽娟、刘佳言、王琴琴、邱立欢、赵晶、周冬杰、刘家英、孔旭冬、张陈胜、马宝娣、刘朝红、沈乃东（排名不分先后）。全书由郁惠蕾和许建和进行统稿和最终译校。尽管如此，由于时间仓促，加之译者水平有限，书中难免有疏漏和不当之处，还望读者不吝赐教。

本书在翻译过程中得到中科院上海生命科学研究院杨胜利院士和南京工业大学欧阳平凯院士等许多前辈、学长及同行朋友的热情鼓励 and 大力支持，同时还得到教育部长江学者奖励计划、国家自然科学基金、科技部 973 计划和 863 计划、新药创制重大专项、生物反应器工程国家重点实验室专项经费以及上海市发酵工程重点学科建设项目的部分资助，在此一并表示衷心的感谢。

译者

2010 年 3 月于上海

前 言

由于一系列因素的综合作用，生物催化逐渐发展成一项变革技术。这些因素包括：①大规模及廉价的 DNA 测序技术；②呈指数增长的基因库数据；③强大的定向进化和高通量筛选技术；④高效的酶蛋白表达系统；⑤天然产物生物合成机理的深入认识；⑥代谢工程与途径工程的工业化成功应用。

因此，近年来报道了许多有关生物催化应用于药物开发、改造与制造等制药工业的成功案例和综述。本书将分五部分介绍这些进展。

- 第 1~4 章介绍新型的生物催化剂、先进的表达宿主以及有关定向进化、高通量筛选与生物过程工程在工业化应用上的最新进展。

- 第 5~8 章主要介绍一些新兴酶，包括醇腈酶、醛缩酶、酮还原酶、氧化酶、腈水合酶与腈水解酶，以及它们的最新应用，尤其是在手性药物及其中间体合成方面。

- 第 9~10 章主要介绍细胞色素 P450 单加氧酶或整细胞催化下，药物代谢物及中间体的合成。

- 第 11~13 章主要介绍组合生物合成、代谢工程与自主酶在复杂药物分子合成与改造中的应用。

- 第 14 章讨论了近年来生物催化在绿色化学与化学发展过程中产生的影响。

我们的目标是提供给读者一本内容准确全面、实用而又见解深刻的著作，希望您能喜爱本书，欢迎多提意见和建议。

陶军华 [Junhua (Alex) Tao]
Elevance Renewable Sciences, USA
Email: Junhua_tao@yahoo.com

林国强 (Guo-Qiang Lin)
Shanghai Institute of Organic Chemistry, China
Email: lingq@mail.sioc.ac.cn

安德列亚斯·李斯 (Andreas Liese)
Hamburg University of Technology, Germany
Email: liese@tuhh.de

目 录

1 酶及其合成应用：概述	1
1.1 引言	1
1.2 酶的分类	1
1.3 酶的发现及优化	2
1.4 酶的生产	2
1.5 酶在合成反应中的应用	3
1.5.1 酮还原酶 (EC1.1.1.2)	3
1.5.2 烯醇还原酶或烯还原酶 (EC1.3.1.16)	3
1.5.3 加氧酶 (EC1.13.×.×. 和 EC1.14.×.×.)	4
1.5.4 醇氧化酶 (EC1.1.3.×)	6
1.5.5 过氧化物酶 (EC1.11.1.×)	6
1.5.6 卤化酶	6
1.5.7 腈水解酶 (EC3.5.5.1)	7
1.5.8 腈水合酶 (EC4.2.1.84)	8
1.5.9 环氧水解酶 (EC3.3.2.×)	8
1.5.10 ω -转氨酶 (EC2.6.1.×)	9
1.5.11 羟腈裂解酶 (EC4.1.2.×)	9
1.5.12 醛缩酶	10
1.5.13 糖苷水解酶 (EC.××××)	10
1.5.14 糖基转移酶 (EC2.4.×.×)	12
1.6 本章小结	13
参考文献	13
2 用于酶发现与生产的表达宿主	19
2.1 引言	19
2.2 如何选择表达系统	20
2.3 原核表达系统	22
2.3.1 在原核生物中进行翻译后修饰	22
2.3.2 大肠杆菌	22
2.3.3 芽孢杆菌	24
2.3.4 荧光假单胞菌	25
2.3.5 其他原核表达系统	25

2.4 真核表达系统	26
2.4.1 酵母	27
2.4.2 丝状真菌	30
2.4.3 昆虫/杆状病毒系统	31
2.4.4 哺乳动物细胞培养	32
2.4.5 其他表达系统	33
2.5 无细胞表达系统	33
2.6 本章小结	35
参考文献	35
3 酶的定向进化和高通量筛选	46
3.1 引言	46
3.2 定向进化DNA文库创建的策略	47
3.2.1 随机突变和半理性设计突变	48
3.2.2 基因重组	49
3.3 定向进化DNA文库的筛选/选择方法	52
3.3.1 利用遗传互补进行体内检测	52
3.3.2 利用化学互补进行体内检测	53
3.3.3 利用表面展示进行体内检测	53
3.3.4 利用裂解液进行体外检测	55
3.3.5 利用核糖体展示进行体外检测	55
3.3.6 体外检测方法：体外区域化	55
3.3.7 仪器化和自动化	56
3.4 工业化应用案例	56
3.4.1 提高活性	56
3.4.2 提高热稳定性	58
3.4.3 改变底物专一性	58
3.4.4 改变产物专一性	59
3.4.5 提高对映选择性	59
3.5 结论和展望	60
参考文献	60
4 反应工程在工业生物转化中的应用	65
4.1 引言	65
4.2 代谢生物转化	66
4.3 酶促生物转化	66
4.3.1 辅助因子再生	67
4.3.2 外消旋化混合物	69
4.3.3 平衡转化率	72

4.3.4 副产物的形成	75
4.3.5 底物抑制	78
4.3.6 底物的低溶解性	81
4.4 本章小结	82
参考文献	84
5 利用羟腈裂解酶合成手性药物中间体	89
5.1 引言	89
5.2 羟腈裂解酶	89
5.2.1 羟腈裂解酶的天然功能和分布	89
5.2.2 羟腈裂解酶的分类	90
5.2.3 新型羟腈裂解酶和高通量筛选方法	93
5.3 羟腈裂解酶催化的反应	95
5.3.1 反应体系	95
5.3.2 酶的固定化	97
5.3.3 连续式反应器	97
5.3.4 亨利反应	98
5.4 氰醇的转化反应	99
5.4.1 羟基的转化	99
5.4.2 腈基/氰基的转化	99
5.4.3 分子内反应	102
5.5 本章小结	104
参考文献	105
6 醛缩酶作为有机合成工具的应用拓展	111
6.1 定向进化和理性突变	111
6.2 反应工程	114
6.3 野生型醛缩酶广泛的底物耐受性	115
6.4 本章小结	117
参考文献	117
7 酮还原酶和醇氧化酶的合成应用	120
7.1 酮还原酶	120
7.1.1 野生菌的整细胞催化	120
7.1.2 重组菌的整细胞催化	123
7.1.3 分离酶催化	127
7.2 醇氧化酶	138
7.2.1 伯醇氧化酶	138
7.2.2 仲醇氧化酶	141
参考文献	142

8 脲水合酶和脲水解酶的应用	150
8.1 引言	150
8.2 脲水合酶	150
8.2.1 新型脲水合酶	150
8.2.2 应用	150
8.3 脲水解酶	160
8.3.1 新型脲水解酶	160
8.3.2 应用	163
8.4 本章小结	173
参考文献	173
9 药物代谢产物的生物合成	179
9.1 引言	179
9.2 利用哺乳动物生物反应器合成药物代谢物	181
9.2.1 体外系统的选择	182
9.2.2 反应条件的优化	184
9.2.3 大规模反应	187
9.2.4 哺乳动物细胞生物反应器实例	188
9.2.5 体内转化实例	189
9.3 利用微生物反应器合成药物代谢物	190
9.3.1 用于代谢产物结构阐释的微生物反应器	190
9.3.2 用于关键代谢产物合成的微生物反应器	191
9.3.3 菌种的筛选	191
9.3.4 微生物的糖苷结合作用	194
9.3.5 大规模反应	195
9.3.6 利用微生物反应器合成药物代谢物实例	196
9.4 重组酶生物反应器	198
9.4.1 利用细胞色素 P450 单加氧酶合成药物代谢产物的优势	200
9.4.2 人类细胞色素生物催化剂	201
9.4.3 微生物细胞色素 P450 酶	201
9.5 本章小结	202
致谢	203
参考文献	203
10 整细胞生物转化在制药工业中的应用	209
10.1 引言	209
10.1.1 用于药物商品化生产的整细胞生物转化过程	209
10.1.2 整细胞生物转化用于合成手性药物中间体	210
10.2 整细胞生物转化相比于分离酶催化的劣势	212

10.2.1 低浓度条件下的底物利用及产物回收	212
10.2.2 发生不需要的副反应	212
10.2.3 底物和产物的细胞毒性	212
10.3 整细胞生物转化相比于分离酶催化的优势	212
10.3.1 比分离酶来源更稳定	213
10.3.2 辅酶再生和多酶协同反应	213
10.3.3 多样性和易获得性	213
10.3.4 使用非商业化可得分离酶催化制备级合成反应	213
10.3.5 成本效应及操作便利性	214
10.4 克服整细胞生物转化劣势的方法	214
10.4.1 利用吸附树脂调控底物和产物的浓度	214
10.4.2 固定化细胞技术	215
10.4.3 水-有机溶剂两相体系	216
10.4.4 基因工程的方法	217
10.5 本章小结	218
参考文献	219
11 药用天然产物的组合生物合成	223
11.1 引言	223
11.2 组合生物合成:结构衍生的天然方法	224
11.3 药用天然产物的组合生物合成实例	227
11.3.1 红霉素(聚酮化合物的生物合成)	227
11.3.2 达托霉素(非核糖体聚肽的生物合成)	230
11.3.3 patellamide(核糖体聚肽的生物合成)	232
11.4 小结与展望	234
参考文献	235
12 代谢工程在药物开发和生产中的应用	241
12.1 引言	241
12.2 代谢工程的工具	242
12.2.1 细胞代谢网络分析工具	242
12.2.2 用于理性遗传改造的工具	244
12.3 聚酮类药物研发中的代谢工程调控	246
12.3.1 聚酮化合物的生物合成	246
12.3.2 利用代谢工程手段改进红霉素生产	246
12.3.3 利用代谢工程在异源宿主中高浓度生产6-脱氧红霉素内酯B	247
12.3.4 其他聚酮化合物生产中的代谢工程调控	249
12.3.5 新型聚酮类药物的研究进展	249
12.4 β -内酰胺生产中的代谢工程调控	250
12.5 类异戊二烯生产中的代谢工程调控	251

12.5.1	类异戊二烯的生物合成途径	252
12.5.2	通过代谢工程的调控增加异戊烯化合物合成前体的供应	252
12.5.3	青蒿素研发和生产中的代谢工程调控	254
12.5.4	类胡萝卜素生产中的代谢工程调控	254
12.5.5	紫杉醇研发和生产中的代谢工程调控	255
12.6	本章小结	258
	参考文献	258
13	多模块合成酶和各组成模块用于化学转化反应	267
13.1	引言	267
13.2	背景	267
13.2.1	多模块合成酶的构造	267
13.2.2	天然产物生物合成周期	270
13.3	宏合酶的代谢工程	271
13.3.1	达托霉素:通过域交换进行代谢调控	271
13.3.2	阿维菌素:通过定向发酵进行代谢调控	274
13.4	用于化学转化的各个结构域	277
13.4.1	单个结构域的功能和结构域自主性	277
13.4.2	环化	277
13.4.3	卤化	280
13.4.4	杂环化/芳构化	281
13.4.5	甲基化	282
13.4.6	氧化	284
13.4.7	糖基化	285
13.5	本章小结	288
	参考文献	288
14	生物催化剂生产药品中的绿色化学	294
14.1	引言	294
14.2	酶促拆分:更高得率,更少废物	297
14.3	生物还原:更绿色的配体,可再生的氢化物供体,无需金属	300
14.3.1	酶法氧化:清洁、高选择性和催化性	302
14.4	C-C键形成:最高的原子经济性	303
14.5	小结与展望	305
	参考文献	305

1 酶及其合成应用：概述

Junhua (Alex) Tao¹ and Jian-He Xu²

¹*Elevance Renewable Sciences, 175E. Crossroads Parkway, Bolingbrook, IL 60440, USA*

²*East China University of Science and Technology (ECUST)*

130 Meilong Road, Shanghai 200237, PR China

1.1 引言

整细胞生物催化的探索研究已有数千年的历史，例如用大麦酿造啤酒。尽管在化学、经济和社会方面，生物催化相比于传统化学方法的优势人们认识已久，但直到近年来随着大规模 DNA 测序、强大的蛋白表达系统、代谢工程和定向进化等技术的突飞猛进，生物催化在制药工业中的应用研究才得以广泛开展。本章将重点讨论已经被分离的酶在小分子药用化合物合成中的应用。

1.2 酶的分类

根据其催化反应的类型，一般可将酶分为六大类（表 1.1）^[1]。据估计，目前大约 60% 生物转化使用的是水解酶，20% 使用的是氧化还原酶^[2]。另外，一些催化生成 C-C 键的反应以及加氧酶所催化的反应也具有非常高的反应效率和非常低的废物生成量，这些新兴酶表现出了很大的应用潜力。

表 1.1 酶的分类

酶的种类	举 例	催化反应
水解酶	脂肪酶、蛋白酶、酯酶、腈水解酶、腈水合酶、糖苷酶、磷酸酯酶	水相体系中的水解反应
氧化还原酶	脱氢酶、氧化酶、加氧酶、过氧化物酶	氧化或还原反应
转移酶	转氨酶、葡萄糖转移酶、转醛醇酶	将一个分子的一个基团转移到另一个分子
裂解酶	脱羧酶、脱水酶、脱氧核糖核酸醛缩酶	非水解的键断裂
异构酶	消旋酶、变位酶	分子内重排
合成酶	DNA 连接酶	键的形成需要三磷酸

1.3 酶的发现及优化

传统上,酶的发现是通过环境样品的筛选与富集培养实现的。近年来由于在大规模 DNA 测序与高通量筛选技术方面的突破,宏基因组学和基于序列的基因挖掘方法都极大地缩短了酶的发现周期。

根据宏基因组学的方法,可以直接从未培养的样品中提取 DNA,然后进行克隆表达^[3]。例如,通过应用定向进化与宏基因组学方法,发现了一株可用于淀粉糖化和乙醇生产的 α -淀粉酶突变株,该酶在 pH 4.5 具有最佳活性,在 105℃ 时具有良好的热稳定性^[4]。

随着公共序列数据库的迅速增长,基于序列挖掘新酶 (genome hunting) 的方法正日益引起人们的注意。该法是根据编码目的蛋白的已知序列去搜索数据库基因来发现同源序列的酶。例如,采用这种方法迅速构建了一个脱氧核糖核酸醛缩酶 (DERAs) 文库,并从中发现一种酶能催化一系列非天然底物发生醛醇反应,并在他汀 (statin) 侧链合成中表现出了优良的立体选择性^[5]。

由于大部分合成应用需要酶催化非天然的底物,因此经常需要对酶的特性进行改进。通常达到该方法之一是对 pH、温度、溶剂、添加剂等反应条件进行优化^[6~9]。另一种方法是在不降低总反应效率的前提下对底物进行修饰^[10]。然而,在大多数商业生产过程中,不得不改变蛋白质序列以增强其反应活性、立体选择性与稳定性。据估计全球 30 多个商品酶是经工程改造后而应用于工业化生产的^[11],然而工程改造中对于哪些氨基酸发生突变的准确预测是非常困难的。自 20 世纪 90 年代中期,已经证实定向进化是一种提高目的蛋白期望特性强而有效的技术^[12,13]。其中易错 PCR 可能是通过改变聚合反应条件获得随机突变体最常用的方法^[14]。另外,同源序列重组或 DNA 洗牌方法也能用于提高突变体的特性^[15]。定向进化主要问题不是突变库的构建,而是建立有效的高通量方法进行筛选^[16]。通常需要筛选上万个突变体,既耗时又费力。随着蛋白质数据库中可获得的蛋白结构越来越多,聚焦定向进化或半理性蛋白设计方法的应用越来越多^[17]。这种方法是根据一个已知同源酶的三维结构通过计算机模拟去构建一个比较接近的蛋白三维结构,然后通过对接研究 (docking study) 寻找可能的“热点 (hot spots)”,最后通过定点饱和突变将其用其他氨基酸替换。该法通常只需要筛选不到上千个突变体,显著缩短了酶的改造周期。事实上大多数有用的突变通常发生在活性位点附近,这一事实使得这种方法更引人注目^[18]。

1.4 酶的生产

虽然仍有一些酶是从动物或植物组织中提取的,但是目前大多数酶还是通过微生物发酵得到的。细菌与真菌是制备工业用酶最常用的宿主菌,它们便于操作并且

产率较高，也易于通过基因工程的改造以提高性能。例如，加入分泌系统可方便酶的分离与纯化。一些最常用的表达宿主菌有大肠杆菌、毕赤酵母、荧光假单胞菌、曲霉与芽孢杆菌。在一些特殊的例子中，也使用哺乳动物或植物细胞^[19~21]。通过调控，分泌宿主应当符合 GRAS (Generally Regarded as Safe, 美国食品药物主管机构批准的检验标准) 安全标准。

酶制备的典型过程通常是将包含编码目的蛋白基因的细胞在三角瓶中培养。在大规模培养过程中，计算机控制的发酵罐或生物反应器需要维持合适的 pH、O₂ 浓度、NH₃ 浓度、CO₂ 浓度，从而达到最大的细胞密度。分批或连续发酵后通过离心或膜过滤收集细胞。然后小规模 of 细胞膜破碎通过超声或细胞破碎仪完成，规模在 5~10L 的细胞破碎通常使用高压均质器完成。离心去除细胞碎片后，收集上清中的粗酶，然后通过无机盐（如硫酸铵）或有机溶剂（如丙酮）沉淀浓缩粗酶液。随后通过透析或各种色谱方法纯化粗酶，进而通过冷冻干燥得到酶干粉^[22,23]。

1.5 酶在合成反应中的应用

通常化学合成最常用的酶包括脂肪酶、酯酶、蛋白酶、酰化酶和酰胺酶等。近来发现并分离了许多重组生物催化剂，显著地扩大了生物转化的工具酶范围。本节将重点讨论这些新兴酶。

1.5.1 酮还原酶 (EC1.1.1.2)

在 NADH 或 NADPH 存在的情况下，酮还原酶 (KREDs) 能将大多数的酮和某些醛催化转化成具有区域选择性或立体选择性的手性醇 (图 1.1)^[24,25]。利用分离酶或整细胞的这类还原反应已成功应用于一系列工业转化过程中。其中由于分离酶具有体积产率较高且没有副反应的优点而备受青睐。这类反应成功的关键是高效且低成本的辅酶再生方法，包括利用甲酸脱氢酶实现 NAD⁺ 的循环和利用葡萄糖脱氢酶实现 NADP⁺ 的循环 (图 1.1)^[26,27]。应当注意的是一些醇脱氢酶也能催化醇氧化生成酮或醛^[28]。

1.5.2 烯醇还原酶或烯还原酶 (EC1.3.1.16)

烯醇还原酶 (ER) 催化 NAD(P)H 依赖性的未活化烯醇碳碳双键以及 α,β -不饱和醛、酮、亚硝胺和腈的还原 (图 1.2)。例如，酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum*) 中的烯醇还原酶具有高立体选择性与区域选择性以及广泛的底物谱^[29]。在 NAD(P)H 存在下，利用来自“老黄酶 (old yellow enzyme)”家族的缺电子烯醇酶的不对称还原可直接得到具有两个手性中心的烷烃。辅助因子可通过甲酸脱氢酶或葡萄糖脱氢酶在体外原位再生。另外，也可以利用烯醇还原酶和实现 NAD(P)H 再生的氧化还原酶共表达的整细胞体系^[30]。

还原反应和辅助因子的再生

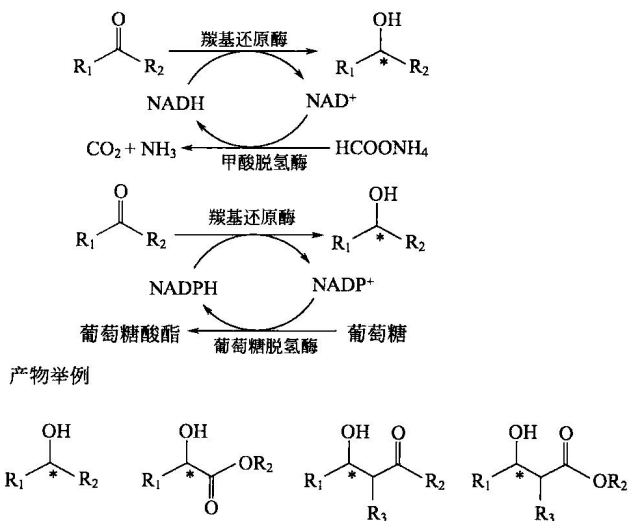
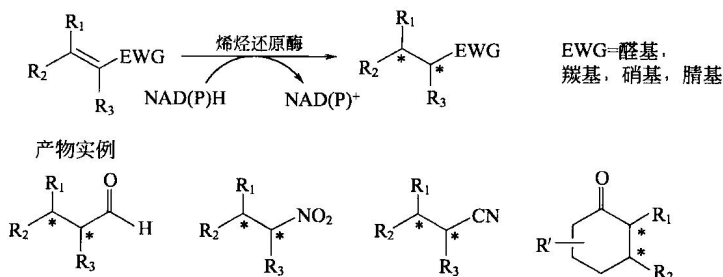
图 1.1^①

图 1.2

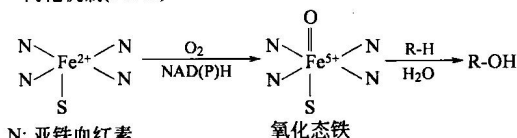
1.5.3 加氧酶 (EC1.13.×.×. 和 EC1.14.×.×.)^②

加氧酶能够直接催化分子氧加入到底物分子上得到氧化的分子^[31,32]。根据加到底物分子上氧原子的个数,加氧酶可分为单加氧酶和双加氧酶。金属依赖的单加氧酶,如P450s通过金属氧化物催化一系列的反应,例如烷烃和芳香烃的羟化和烯烃的环氧化(图1.3)。而FAD依赖型的单加氧酶(FAD-dependent MOs)能催化氧化杂原子(硫、氮、硒、磷),FAD-过氧化氢依赖型的单加氧酶能催化Baeyer-Villiger反应(图1.4)。

① 原著中 HCOONH₂ 有误, 改为 HCOONH₄。

② 原著中为 EC.××××, 根据酶学委员会分类加氧酶主要可分为 EC.1.13.×.×. 和 EC.1.14.×.×.。

简化机制(P450s)



N: 亚铁血红素

S: 半胱氨酸残基

氧化态铁

举例:

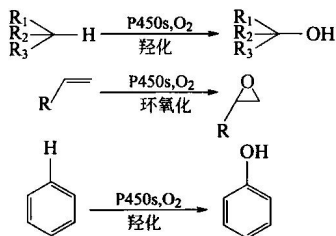
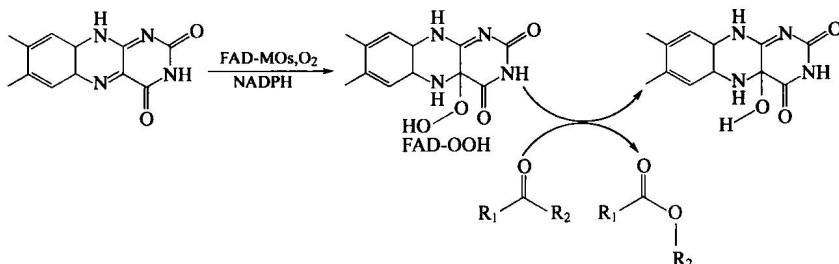


图 1.3

简化机理(FAD依赖型单加氧酶)



实例:



图 1.4

双加氧酶通常包含一个紧密结合的铁原子，催化烯丙基分子和羧酸类物质的氢过氧化和芳香类物质的双羟基化（图 1.5）^[33]。

目前这些氧化反应通常使用整细胞，产物通常是不可预测的。新型加氧酶和高效蛋白表达宿主的开发，仍是进一步扩大其在化学合成和药物代谢研究领域应用的关键^[34~37]。

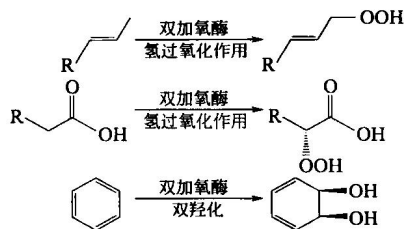


图 1.5