

腈水解酶在医药中间体生物催化研究中的最新进展*

龚劲松 李 恒 陆震鸣 史劲松 许正宏**

(江南大学药学院 无锡 214122)

摘 要 腈水解酶是生物催化领域中的一种重要催化剂,可用于羧酸的生物合成,反应过程具有条件温和、催化效率高、选择性突出、工艺绿色环保等特点,在医药中间体的制备中具有重要应用,符合原子经济性和绿色化学的发展方向。相关酶种的挖掘及改造已逐步成为新的研究热点,许多腈水解酶催化剂已被开发应用于医药中间体的合成。随着现代分子生物学技术的进步以及生物催化进入第三次发展浪潮,利用基因工程手段构建的基因工程菌或纯化酶作为催化剂已变得较为普遍,提高催化剂的催化潜力、改善其催化特性以最大程度的体现腈水解酶合成反应的独特优势,将为腈水解酶应用于更多医药中间体的合成奠定基础。本文综述了用于医药中间体合成的腈水解酶的应用与发展现状,并探讨了该领域研究所面临的前所未有的机遇与挑战。

关键词 腈水解酶 医药中间体 生物催化 有机酸

中图分类号:Q55; Q819; TQ032 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2015)04-0448-11

Recent Progress in the Application of Nitrilase in the Biocatalytic Synthesis of Pharmaceutical Intermediates*

Gong Jinsong Li Heng Lu Zhenming Shi Jinsong Xu Zhenghong**

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Nitrilase is a crucial enzyme in the field of biocatalysis, which can be used for biosynthesis of various carboxylic acids from corresponding nitriles. This approach is usually employed for preparing pharmaceutical intermediates because of its superior catalytic characteristics including mild reaction conditions, high conversion efficiency, prominent selectivity, and eco-friendly nature. Therefore, the nitrilase-mediated biocatalysis conforms to the development directions of atom economy and green chemistry. It has drawn substantial attention from scholars and entrepreneurs due to its application potential. Several studies have been performed to explore its application in synthesis of several pharmaceutical intermediates and numerous nitrilases have been developed as the industrial catalysts. Whereas, mining and modification of nitrilases are gradually becoming research focuses. Moreover, with the rapid advances of modern molecular biology as well as the advent of the third wave of biocatalysis, gene engineering has become a common approach for constructing recombinant strains. The significant advantages of nitrilase-mediated biocatalysis can be represented in maximum degree through improving the catalytic activity of nitrilase and modifying its catalytic properties, which would lay the foundation for more applications of nitrilases in the future. In this review, the application and development for the synthesis of

收稿: 2014 年 11 月, 收修改稿: 2014 年 12 月, 网络出版: 2015 年 4 月 1 日

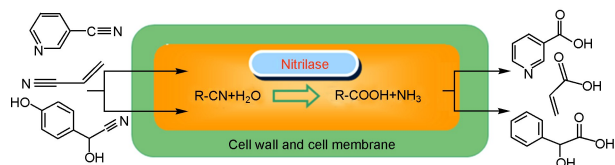
* 国家自然科学基金项目(No. 21406088, 21206055), 江苏省自然科学基金项目(No. BK20140133)和“十二五”国家科技支撑计划课题(No. 2012AA022204C)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21406088, 21206055), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20140133), and the National Key Technology R&D Program of China for the 12th Five-year Plan (No. 2012AA022204C).

** Corresponding author e-mail: zhengxu@jiangnan.edu.cn

pharmaceutical intermediates with nitrilase are summarized, as well as unprecedented opportunities and challenges in this field are discussed.

Key words nitrilase; pharmaceutical intermediates; biocatalysis; carboxylic acid



Contents

- 1 Introduction
- 2 Research overview of nitrilase
- 3 Existence range of nitrilase
- 4 Type of nitrilase catalysts and obtaining manners
 - 4.1 Wild enzyme
 - 4.2 Genetically engineered enzyme
- 5 The applications in the synthesis of pharmaceutical intermediates
 - 5.1 Picolinic acid
 - 5.2 (*R*)-Mandelic acid and its derivatives
 - 5.3 Cyanocarboxylic acid
 - 5.4 Pharmaceutical amino acid
 - 5.5 Glycolic acid
- 6 Conclusion and outlook

1 引言

腈水解酶(nitrilase; EC 3.5.5.1)是腈水解酶超级家族中一种重要的生物催化剂,它能将腈类化合物中的腈基直接转化为羧基从而制备获得羧酸,该途径与传统工艺相比具有反应条件温和,无需高温高压、强酸强碱,污染较少,催化特异性强,生产效率高特点,因而目前已在医药、环保、化工、食品添加剂、纺织、农业生产等领域获得广泛应用^[1, 2]。尤其在医药生产领域,正是由于腈水解酶介导的生物催化反应所具备的这些优点,腈水解酶应用于医药有机合成的相关研究在近年来已得到快速发展,被认为是推动工业生物催化进步的重要方向, (*R*)-扁桃酸、(*R*)-3-氯扁桃酸(BASF, Mitsubishi Rayon)及烟酸(LONZA)等医药中间体的成功商业化生产更是充分证明了这一点^[3, 4]。但在该反应中,由于底物腈携带一个—CN基团而具有一定毒性,会导致细胞变性、酶失活,另外目前已报道的多数腈水解酶对外界环境条件较为敏感,因而如何获得酶活性高、稳定性好的腈水解酶生物催化剂是工艺的关键。随着现代化学进展, 2015, 27(4): 448 ~ 458

基因工程、全基因合成、生物信息学、定向进化等技术的日臻成熟,生物催化行业已步入第三次发展浪潮^[5, 6],腈水解酶的研究面临了前所未有的机遇。同时化学及医药工业对于绿色工艺的需求也推动了绿色化学和工业生物催化技术的发展与推广,腈水解酶作为其中重要的催化剂之一正逐步显示出其广阔的应用前景。因此,本文将为该领域未来更广泛而深入的研究打下更好的基础。

2 腈水解酶的研究概况

20 世纪 60 年代,首个植物腈水解酶和细菌腈水解酶分别在大麦叶(Barley)^[7]和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas*)^[8]中被发现。近半个世纪来各种不同来源的腈水解酶被发现,包括细菌、丝状真菌、酵母、植物等有机体均能产生各类具有不同底物特异性的腈水解酶。而微生物来源的腈水解酶由于其在工业上操作简便、发酵产量大,自 20 世纪 80 年代以来便受到了很多关注。日本科学家 Kobayashi 及其同事总结已有资料将这些腈水解酶大致分为三大类:脂肪腈水解酶、芳香腈水解酶和芳基乙腈水解酶^[9]。腈水解酶的这种多样性也决定了其广泛的应用范围,迄今为止,腈水解酶的应用研究领域已涵盖:(1)工业上用于烟酸、扁桃酸、羟基乙酸、丙烯酸等医药前体、化工原料和食品添加剂的生物制造;(2)农业及工业领域,用于溴苯腈和碘苯腈等农药污染的农业废水、乙腈和丙烯腈等污染的工业废水的生物除污;(3)生物材料及纺织制造业中,用于聚合物的酶法表面修饰。目前国外已针对以上领域采用不同来源的腈水解酶作为研究目标进行了广泛而深入的探索实践;国内方面,主要有浙江工业大学、华东理工大学、江南大学、中科院、清华大学等机构开展了以细菌腈水解酶为研究目标的催化剂筛选、产酶发酵优化、细胞固定化、酶分离纯化及生物转化工艺研究等工作。

3 腈水解酶的存在范围

腈水解酶在自然界中广泛存在。迄今为止,假单胞菌属(*Pseudomonas*),红球菌属(*Rhodococcus*),产碱杆菌属(*Alcaligenes*),红细菌属(*Rhodobacter*),诺卡氏菌属(*Nocardia*),鞘氨醇单胞菌

(*Sphingomonas*), 不动杆菌属(*Acinetobacter*), 芽孢杆菌属(*Bacillus*), 短根瘤菌属(*Bradyrhizobium*), 火球菌属(*Pyrococcus*), 节杆菌属(*Arthrobacter*) 和嗜热芽孢菌(*Geobacillus*) 等不同来源的细菌菌株; 赤霉菌属(*Gibberella*), 青霉菌属(*Penicillium*), 曲霉菌属(*Aspergillus*) 及镰刀霉属(*Fusarium*) 等来源的丝状真菌菌株; 隐球菌属(*Cryptococcus*), 球拟酵母菌属(*Torulopsis*) 和外瓶霉属(*Exophiala*) 等来源的酵母菌株; 白芥(*Sinapis*), 芜菁(*Brassica*), 拟南芥

(*Arabidopsis*) 等来源的植物均被报道存在腈水解酶活性^[2, 10]。这些催化剂被用于选择性水解双腈获得单腈单酸, 直接水解合成苯甲酸及苯乙酸的衍生物、及烟酸和扁桃酸等各类药物中间体, 并表现出良好的酶学特征和催化效率。相比而言, 具有不同底物特异性的细菌菌株目前已被大量报道并广泛应用于医药中间体的生物合成中, 其他菌属来源的腈水解酶则相对报道较少。表 1 列举了近年来本领域所获得的一些腈水解酶催化剂。

表 1 近年来文献报道的应用于医药中间体合成的腈水解酶催化剂

Table 1 The reported biocatalysts displaying nitrilase activity for pharmaceutical applications in recent literatures

biocatalyst	type	product	ref
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> LHS-305	purified recombinant enzyme	cyanocarboxylic acids	11
<i>Pseudomonas putida</i> CGMCC3830	resting cells of wild type	isonicotinic acid	12
<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	immobilized enzyme	D-N-formyl-phenylglycine	13
<i>S. wittichii</i> RW1	resting cells of recombinant <i>E. coli</i>	D-phenylglycine	14
<i>Alcaligenes faecalis</i> MTCC126	immobilized recombinant cells	nicotinic acid	15
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 934	resting cells of wild type	2-hydroxyphenylacetic acid	16
<i>Alcaligenes faecalis</i>	purified recombinant enzyme	(<i>R</i>)-mandelic acid	17
<i>Gibberella intermedia</i>	immobilized cells of wild type	nicotinic acid	18
<i>Rhodococcus</i> sp. CCZU10-1	immobilized cells of wild type	terephthalic acid and isophthalic acid	19
<i>Alcaligenes</i> sp. MTCC 10675	resting cells of wild type	(<i>R</i>)-mandelic acid	20
<i>P. putida</i> CGMCC3830	purified recombinant enzyme	nicotinic acid	21
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	resting cells of recombinant <i>E. coli</i>	(<i>S</i>)-2-cyano-2-methylpentanoic acid	22
<i>Alcaligenes faecalis</i> ZJUTB10	immobilized cells of wild type	(<i>R</i>)-mandelic acid	23
<i>Gordonia terrae</i>	resting cells of wild type	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	24
<i>Labrenzia aggregata</i>	resting cells of recombinant <i>E. coli</i>	(<i>R</i>)- <i>o</i> -chloromandelic acid	25
<i>Nocardia globerula</i> NHB-2	resting cells of wild type	isonicotinic acid	26
<i>Alcaligenes</i> sp. ECU0401	immobilized recombinant cells	(<i>R</i>)-mandelic acid	27
<i>N. globerula</i> NHB-2	resting cells of wild type	nicotinic acid	28
<i>Fusarium oxysporum</i> H3	resting cells of wild type	glycine	29
<i>Alcaligenes faecalis</i>	purified recombinant enzyme	(<i>R</i>)-2-Cl-mandelic acid	30
<i>Pseudomonas putida</i>	immobilized recombinant enzyme	mandelic acid	31
<i>Exophiala oligosperma</i> R1	resting cells of wild type	phenylacetic acid and 2-hydroxyphenylacetic acid	32
<i>Pseudomonas</i> sp. 6-1	resting cells of wild type	hydroxyphenylacetic acid	33
<i>Aspergillus niger</i> 3.795	resting cells of wild type	isonicotinic acid	34

4 腈水解酶催化剂种类及获取方式

尽管传统研究中以野生菌游离细胞或其纯化酶作为催化剂进行腈类化合物的生物转化更常见, 但是随着现代生产工艺尤其是医药工业对于催化剂的催化特征和产品质量要求的不断提升, 近年来, 采用通过基因工程手段构建的基因工程菌或其纯化酶作为催化剂已变得较为普遍(表 1)。作为一种生物催化剂, 实际使用的腈水解酶大体分为天然酶和基因工程酶, 以及这两种酶的不同存在形式, 包括游离细胞、纯化酶、固定化细胞或固定化酶等; 其中基因工程酶还包括多种不同来源, 如从野生菌直接克隆表达获得的重组酶、宏基因组挖掘及基因挖掘获得的

新型酶、以及经过分子修饰获得的改造酶等。

4.1 天然酶

腈水解酶的传统筛选方法主要以选择性筛选为主, 尽管该方法工作量大、筛选周期长, 但仍然是目前获取腈水解酶的主要途径。选择性筛选培养基通常是以腈类化合物及其类似物为唯一碳/氮源在固体或液体培养基中进行富集培养, 经过多轮选育最终获得目的菌株。本课题组 Wu 等^[35]以 0.1% 的 3-氰基吡啶为唯一氮源, 经过四轮转接和最终的复筛, 从选择性平板上获得一株高产真菌腈水解酶的赤霉菌(*G. intermedia*) CA3-1。为了获得一株能高效选择性水解扁桃腈的菌株, Xue 等^[36]采用苯乙腈为唯一碳氮源, 在土壤样品中筛选到一株产腈水解酶的

粪产碱杆菌(*A. faecalis*);为了进一步提高其催化潜力,他们采用紫外结合等离子束诱变的方式将菌株的比酶活提高了近7倍。Oliveira等^[37]从巴西的海洋环境中筛选到一株产腈水解酶的聚多曲霉(*A. sydowii*) Ce19,该菌株能高效降解苯乙腈及其衍生物。

腈水解酶的筛选还可利用反应生成产物的相应特征,在培养基中添加pH指示剂作为鉴别剂以提高筛选效率。如Gong等^[29]在筛选甘氨酸腈水解菌的过程中在筛选平板上添加了0.01%(w/v)的溴百里香酚蓝作为指示剂以提高筛选效率,根据菌落周围颜色变化来对潜在目标菌株进行判断,可显著减少筛选工作量。另外,随着筛选方法的不断改进,近年来文献中借助灵敏的检测方法、采用微孔板进行高通量筛选的方法也表现出了一定优势。曹明乐等^[38]采用Berthelot法进行高通量初筛以及HPLC法复筛获得了一株较广底物谱的腈水解酶产生泛菌(*Pantoea* sp.),该菌株能较好的水解3-羟基丙腈及4-羟基苯乙腈等腈类化合物。赵素娟等^[34]利用腈水解反应中羧酸类产物将引起体系pH值降低的特点,选用溴百里香酚蓝作为筛选指示剂,在96孔微孔板中进行微量化的快速筛选,最终筛选到一株对4-氰基吡啶表现出较高活性的黑曲霉(*A. niger*) 3.795。

4.2 基因工程酶

4.2.1 重组表达酶

从自然界所获得的天然催化剂是自然进化的产物,在发酵产量和催化特征方面多数会受到宿主自身条件的限制,通常无法满足工业生产的需求;而且,即使现有催化剂生产效率已达到较高水平,继续改善其催化潜力或寻找更好的催化剂对于生产工艺而言依然十分必要。从野生菌或自然环境中直接挖掘并获取酶的编码基因且在外源的成熟宿主中表达将为腈水解酶的广泛应用提供便利。

获得腈水解酶的编码基因是后续工作的基础,以筛选得到的野生菌株基因组为目标通过各种PCR技术进行克隆是最常见的方式。自20世纪80年代美国加州Calgene公司的Stalker等^[39]开创性地扩增获得首个来源于臭鼻克雷伯氏菌(*Klebsiella ozaenae*)的腈水解酶编码基因,并在大肠杆菌(*E. coli*)中成功表达出重组腈水解酶以来,大量的用于水解不同腈类底物的野生菌腈水解酶基因被克隆出来。如近期文献所报道的,用于水解双腈和3-氰基吡啶的类球红细菌(*R. sphaeroides*) LHS-305^[11]及

赤霉菌(*G. intermedia*) CA3-1^[40]腈水解酶基因,已分别成功从相应的野生菌DNA中扩增获得,经外源表达后重组菌均表现出良好的腈水解酶活性。本课题组朱小燕等^[21]采用CODEHOP PCR, Degenerate PCR及TAIL-PCR等多种PCR技术从恶臭假单胞菌(*P. putida*) CGMCC3830中成功扩增获得了腈水解酶的编码基因,Blast结果表明核苷酸序列最高同源性仅为63%,同源性最高的基因为红球菌(*Rhodococcus* sp.) BX2腈水解酶基因(JN255154),在大肠杆菌中成功表达的重组酶对底物3-氰基吡啶的酶活可达48.8 U/mg(纯化酶)。

4.2.2 宏基因组挖掘酶

由于自然界环境样品中不可培养的微生物占99%以上,可培养获得的微生物仅占到总数的不足1%,传统筛选方法严重制约了自然环境中酶资源的发掘与利用。采用宏基因组学(metagenomics)技术则可巧妙地避开传统的分离培养过程,该方法通过提取特定环境样品中的微生物总基因组、构建小片段文库、从中进行筛选和挖掘功能基因^[41]。DeSantis等^[42]针对从不同地域所采集到的多个环境样品构建了一个基因组文库、进行腈水解酶活性筛选,并以该家族酶活性中心所特有的保守氨基酸残基三联体Glu-Lys-Cys为依据,在序列层面确定腈水解酶基因,共选取超过200个新的腈水解酶基因;他们继续以扁桃腈为底物进行初筛,确定其中27个腈水解酶能催化扁桃腈水解得到相应的扁桃酸,且ee值>90%;选定具有最高催化活性的Nitrilase I用于后续扁桃腈生物转化,结果表明扁桃酸的收率能达到86%,ee值为98%。Bayer等^[43]从不同来源的具有代表性的土壤样品(污染的和无污染的)中构建了多个宏基因组文库,以腈类化合物为唯一氮源筛选具有腈水解酶活性的单克隆;最终选取获得了一株表达腈水解酶*nit1*的大肠杆菌(*E. coli*)进行后续研究,对*nit1*的序列分析结果表明该基因序列与目前已报道的基因序列同源性均低于66%,且这些较相似序列均未曾获得表征;以双腈为底物进行生物转化,结果显示*nit1*具有良好的区域选择性,能成功转化合成单腈单酸。

4.2.3 基因挖掘酶

目前基因数据库中已登录的全基因组和其他基因序列数据正在逐步增加,尤其随着目前测序成本的不断降低,这些数据更是迅猛增长(见GenBank及GOLD等数据库)^[41]。对于从事工业酶及有机合成研究的学者来说这无疑是一种珍贵的资源;但如

何在较短时间内快速准确地从如此海量的数据库获得所需目标基因序列成为了工作的关键。随着目前后基因组时代的来临,“基因挖掘”技术(genome mining)逐步受到重视。该技术主要是根据实际需要、有针对性地选取某个具有代表性的探针酶为模板在数据库中进行比对和搜索,深入挖掘具有序列或结构同源性的酶基因,尤其是从未获得表征或报道的基因,进而可通过设计特异性引物从目标物种扩增该编码基因并重组表达;另外,基因合成技术的进步为廉价且快捷的合成基因序列提供了可能,因此所挖掘的序列可直接进行全合成。借助日益成熟的生物信息学和计算机软件模拟技术,并结合针对特定宿主的密码子优化,则能进一步显著提高所挖掘基因表达的成功率,相比传统筛选,该方法在开发周期、人力物力成本、筛选效率等方面已展现出其独特优势。Qiu 等^[44]选取具有较高苯胺基乙腈水解活力的荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) EBC191 腈水解酶基因序列为模板进行 BLAST 检索,序列选取中剔除同源性低于 40% 的序列以提高成功率;以从菌种保藏机构获取的相应菌株的基因组 DNA 为模板,最终选出 15 段潜在序列建立小型酶库,以苯胺基乙腈为底物进行酶活筛选,其中鞘氨醇单胞菌(*S. wittichii*) RW1 表现出最高对映选择性和催化活力,序列分析结果显示该序列与其他腈水解酶最高同源性仅为 49%。捷克学者 Kaplan 等^[45]则通过在 GenBank 数据库中搜索未获得表征或文献未报道的假定真菌腈水解酶基因,最终锁定了 3 个分别来源于串珠状赤霉菌(*G. moniliformis*),黑曲霉(*A. niger*) CBS 513.88,粗糙链孢霉菌(*N. crassa*) OR74A 的假定腈水解酶基因,基因的氨基酸序列同源性最高约为 40%;按照大肠杆菌(*E. coli*)表达体系的密码子偏好性进行密码子优化,并连接 pET-30a(+)载体、重组表达,以苯乙腈为底物测定酶活,结果表明这些基因挖掘酶均表现出较高酶活,尤其是黑曲霉和粗糙链孢霉菌的酶活分别可达 2500 和 2700 U/L,约为串珠状赤霉菌的 6 倍。

4.2.4 基因改造酶

随着现代分子生物学技术的进步,从分子层面进一步对腈水解酶催化剂进行改造逐渐成为现阶段的研究热点。已有方法包括非理性改造和理性改造;理性改造通常是在熟知腈水解酶蛋白空间立体结构、氨基酸序列以及催化机制等信息的前提下,有针对性地对腈水解酶序列进行精确设计和改造,从而获得具有催化性能改进的突变体;非理性改造是

无需事先了解酶的空间结构及催化机制等信息,模拟达尔文的自然进化在体外改造酶基因,人为设定特殊的进化条件、通过高通量的筛选手段定向筛选出所需性能突变体的方法。利用这些技术可对腈水解酶的催化活力、稳定性、底物特异性、立体选择性、副产物生成及底物耐受性等特征进行改造。DeSantis 等^[46]以 3-羟基戊二腈为底物在腈水解酶介导下催化合成(*R*)-4-氰基-3-羟基丁酸(降胆固醇药物立普妥的中间体),为提高工艺效率,他们采用点饱和突变技术改造腈水解酶用于筛选选择性及高底物浓度下的催化产率均提高的突变体,共构建了 330 个氨基酸位点上的 10528 个突变体,最终筛选获得一株选择性及活性最高的突变株 A190H 用于后续研究,在 3 M 的底物浓度、20 °C 的反应温度并同时搅拌的情况下经过 15 h 转化获得了 ee 值为 98.5%、产率为 96% 的相应产物,催化剂的体积产率达到 619 g/L/d。Liu 等^[47]以 PDB 蛋白质数据库中已有的古细菌(*Pyrococcus abyssi*)腈水解酶晶体结构为主要模板,构建了敏捷食酸菌(*Acidovorax facilis*)腈水解酶的蛋白同源模型,并通过分子对接及序列比对,他们选取了多个位点进行单点及多点的定点突变,以期提高敏捷食酸菌腈水解酶的催化活力,最终获得了一株腈转化率提高 41% 的三点突变株。然而目前已报道的腈水解酶晶体结构仅有如上所述的古细菌腈水解酶一个,这使得理性改造研究工作的开展捉襟见肘。在此背景下,基于序列比对分析的半理性设计方法受到更多重视,尤其是腈水解酶催化活性中心附近氨基酸残基的定点改造成为了研究重点。德国学者 Kiziak 等^[48]在仅获得荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) EBC191 腈水解酶编码基因的基础上,研究活性中心附近氨基酸残基对于催化活力和副产物酰胺生成的影响,他们采用定点突变的方式构建了活性中心 Cys 残基附近多个氨基酸残基的突变体,结果表明所构建的 163 位突变体 C163Q 在以扁桃腈为底物进行催化时酶活力降低,但扁桃酰胺生成量却显著增加。Petříčková 等^[49]以前期经基因挖掘获得的两个来源于黑曲霉(*A. niger*) CBS 513.88 和粗糙链孢霉菌(*N. crassa*) OR74A 的重组腈水解酶为研究目标,开展序列比对分析,寻找催化半胱氨酸残基附近的特征氨基酸残基,构建了多株酰胺生成及酶活发生变化的突变体,其中来源于粗糙链孢霉菌的腈水解酶突变体 W168A 在以扁桃腈和苯丙腈为底物时酰胺生成量明显提高。另一种较受欢迎的基因改造方式是定向进化。澳大利亚科学

家 Winkler 的团队采用易错 PCR 技术结合高通量筛选方法用于改善粪产碱菌 (*A. faecalis*) 腈水解酶的催化活力及 pH 稳定性^[30]; 通过多轮易错 PCR 及后续的阳性突变位点的组合突变, 获得了多株底物转化率和在低 pH 值条件下稳定性显著提高的突变株, 采用其中一株突变体在 pH = 4.5 条件下转化氯代扁桃腈的结果显示底物能被完全转化生成相应的有机酸。从目前的应用情况来看, 尽管工作量较大、目标不够明确, 定向进化技术仍不失为一种有效的基因修饰策略。

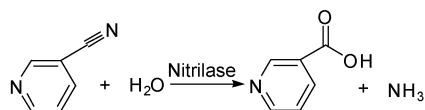
5 在医药中间体合成中的应用

近几年来腈水解酶的生物催化技术正突飞猛进的发展, 尤其是在医药中间体生产中的应用已经取得了瞩目的成就, 相关文献发表和专利申报呈现稳健增长之势。总体来看, 最近几年腈水解酶在医药中间体合成中的应用主要集中于吡啶甲酸、扁桃酸及其衍生物、单腈单酸以及药用氨基酸等这几大类化合物。

5.1 吡啶甲酸

吡啶甲酸包括烟酸、异烟酸和 2-吡啶甲酸这三种同分异构体。烟酸也称维生素 PP 或维生素 B₃, 是人体必需的 13 种维生素之一, 作为药物中间体可合成多种用于治疗皮肤性疾病、高血压症和冠心病等的药物, 也可用于制备异烟肼、尼可刹米及烟酸肌醇酯; 异烟酸是合成抗结核药物的中间体, 其衍生物异烟酰肼和异烟酰肼即用作抗结核药物; 2-吡啶甲酸在医药生产中用于制备卡波卡因药物, 还可降低糖尿病人的血糖水平和胰岛素抗药性, 而且能预防心脑血管病^[50]。在早期研究中, 采用腈水解酶介导的生物催化途径合成烟酸即受到了多方学者的重视; 京都大学学者 Mathew 早在 1988 年即尝试采用腈水解酶进行 3-氰基吡啶转化合成烟酸(图式 1), 作者以玫瑰红球菌 (*R. rhodochrous*) J1 游离细胞为催化剂, 在 25 °C、pH = 8.0 并振荡的条件下, 经过 26 h 内 7 次流加底物, 每批次 200 mM, 最终累积制备烟酸 1.4 M (172 g/L), 底物完全转化^[51]。近期本课题组李恒等^[18]采用经海藻酸钙固定化的赤霉菌 (*G. intermedia*) 作为催化剂进行 3-氰基吡啶的生物转化, 产率可达到 205.7 g 烟酸/g 干细胞。数十年来, 红球菌 (*Rhodococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*)、芽胞杆菌 (*Bacillus*)、镰刀菌 (*Fusarium*)、曲霉菌 (*Aspergillus*)、赤霉菌 (*Gibberella*) 等各类不同菌属来源的腈水解

酶产生菌株已被广泛用于烟酸的生物合成中。对于异烟酸的生物合成研究则起步相对较晚, 而且目前仅有少数菌株被报道可用于 4-氰基吡啶的生物转化。Sharma 等^[26]尝试采用小球诺卡氏菌 (*N. globerula*) NHB-2 游离细胞进行批次流加转化合成异烟酸取得了良好效果, 每批次 20 min 补加 100 mM 底物, 在第 7 批次时受到底物抑制, 在 35 °C 条件下最终 400 min 内共合成 958 mM (117.9 g/L) 异烟酸。Zhu 等^[12]利用产腈水解酶的恶臭假单胞菌 (*P. putida*) CGMCC3830 游离细胞为催化剂, 在 30 °C 条件下 200 min 内可合成 123 g/L 异烟酸。Maksimova 等^[52]则采用荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) C2 腈水解酶细胞悬液转化合成异烟酸, 16 g/L 4-氰基吡啶能在 5 h 内转化生成相应的异烟酸, 他们还同时考察了高岭土固定化细胞的转化效果, 结果显示固定化后酶活并无显著变化。2-氰基吡啶转化合成 2-吡啶甲酸的研究鲜有报道。他们将荧光假单胞菌用于 2-氰基吡啶的生物转化, 采用细胞悬液进行转化时酶活为 8.81 mmole/g/h, 这一数据明显低于 4-氰基吡啶为底物时的酶活性 (19.63 mmole/g/h)^[52]。究其原因可能与底物中取代基位置在邻位形成空间位阻有关。不过细胞悬液酶活依然要比高岭土固定化细胞高 60% 左右, 采用细胞悬液转化 20 g/L 2-氰基吡啶, 反应 30 h 后转化率为 90%。

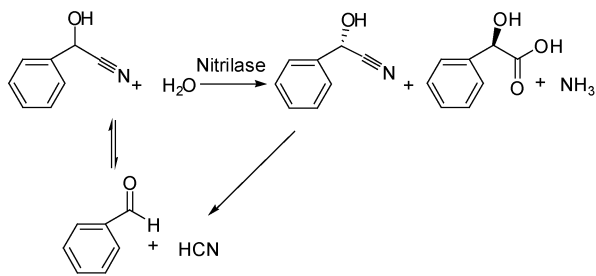


图式 1 烟酸的生物合成

Scheme 1 Synthesis of nicotinic acid

5.2 扁桃酸及其衍生物

扁桃酸在医药领域具有重要的应用, 可用于合成头孢菌素、血管紧张肽转化酶抑制剂、抗肥胖药物及抗肿瘤药物等, 也可用作防腐剂。由于单一构型的扁桃酸与外消旋扁桃酸相比药效更高、副作用更低, 具有广阔的市场前景, 采用高立体选择性的腈水解酶拆分外消旋的扁桃腈合成单一对映体扁桃酸受到了广泛关注(图式 2)。以正丁腈为诱导剂培养的粪产碱菌 (*A. faecalis*) ATCC 8750 腈水解酶对扁桃腈具有较高特异性, 用游离细胞催化剂选择性催化外消旋扁桃腈可生成相应 (*R*)-扁桃酸, 产物收率为 91%, ee 值可达 100%^[53]。Banerjee 等^[54]将恶臭假单胞菌 (*P. putida*) MTCC 5110 腈水解酶基因在大肠杆菌中进行了重组表达, 并对产酶条件进行了系



图式 2 (R)-扁桃酸的生物合成

Scheme 2 Synthesis of (R)-mandelic acid

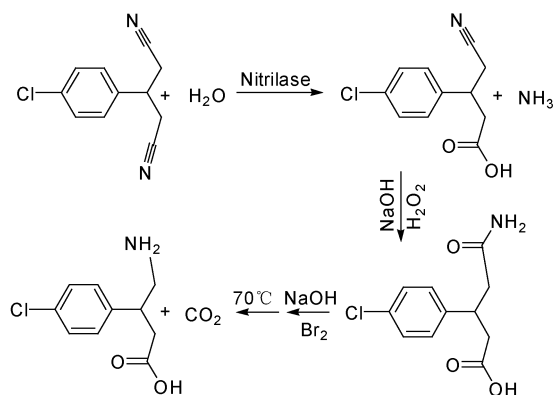
统优化,重组酶对扁桃腈表现出较高的腈水解酶活力,最终转化结果表明(R)-扁桃酸的收率及 ee 值分别达到 87% 和 99.99%。为了提高催化剂的重复利用批次和稳定性,Zhang 等^[55]采用戊二醛交联的方法用于固定大肠杆菌重组菌株,该重组菌表达产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)腈水解酶,结果发现固定化细胞的稳定性相比游离细胞提升约 5 倍,300 mM 扁桃腈经过 2 h 转化可获得 280 mM (R)-扁桃酸,ee 值和产率分别为 98% 和 352.6 g/L/d,而相同底物浓度下游离催化剂经过 12 h 转化仅能收获 10 mM 产物;在 2 L 体系的重复分批补料实验中,反应累积 1.6 M 产物,共收获 450 g 光学纯的(R)-扁桃酸。Ni 等^[56]采用固定化的重组大肠杆菌(*E. coli*) M15/BCJ2315 在两相体系中进行扁桃腈的生物转化,该重组菌表达洋葱伯克氏菌(*Burkholderia cenocepacia*) J2315 腈水解酶,通过使用乙酸乙酯-水的两相反应体系,1 M 扁桃腈能在 4 h 内转化完全,产物收率和 ee 值分别为 99% 及 95%,同时固定化细胞可重复使用 6 个批次。目前以扁桃腈为底物通过腈水解酶合成扁桃酸的工艺已在 BASF 建成投产,最终提取的产品化学纯度可达到 99%,产物 ee 值为 97.4%^[57]。

(R)-邻氯扁桃酸是合成氯吡格雷的前体,用作抑制血小板聚集的药物,全球市场需求极大。Zhang 等^[25]采用经基因挖掘获得的聚团拉布伦茨氏菌(*Labrenzia aggregata*)腈水解酶为催化剂转化邻氯扁桃腈,酶基因在大肠杆菌(*E. coli*) BL21 (DE3) 宿主中重组表达,为了消除底物抑制效应及提高产率,他们还采用了甲苯-水的两相体系进行催化,300 mM 底物能在 8 h 内转化完全,产物产率和 ee 值分别为 94.5% 和 96.5%。Schreiner 等^[30]则采用经定向进化改造获得的粪产碱菌(*A. faecalis*)腈水解酶在 pH = 4.5 的条件下转化邻氯扁桃腈制备(R)-邻氯扁桃酸,底物转化率达 100%,最终产物 ee 值

为 99%。

5.3 单腈单酸

单腈单酸作为药物中间体十分常见,采用二腈类化合物进行选择性的水解即可制备。然而常规的化学水解很难一步实现该反应,并且产率难以提升,而采用酶法则有望解决该问题。Chauhan 等^[58]扩增获得一株敏捷食酸菌(*Acidovorax facilis*) 72W 的腈水解酶编码基因,并在大肠杆菌中进行了过量表达,重组酶对脂肪族二腈具有较强的立体选择性,能将 2-甲基戊二腈转化为 4-氰基戊酸,底物转化率达到 100%,产物中无酰胺化合物生成,2-甲基戊二酸是唯一的副产物且含量低于 2%;进一步使用固定化细胞进行连续批次转化,催化剂可重复利用 195 个批次,催化剂产率为 3500 g 4-氰基戊酸/g 干细胞,并且最终催化剂仍能保留 67% 的腈水解酶活性。普瑞巴林,又名(3S)-3-氨基-5-甲基己酸,是由 Pfizer 公司开发的新型 γ -氨基丁酸受体拮抗剂^[59],2004 年首次经欧盟批准上市用于治疗癫痫发作,商品名为 Lyrica,至今全球累计销售超过 150 亿美元,是名副其实的畅销药物。Xie 等^[60]克隆获得了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的腈水解酶基因,并通过随机突变结合高通量荧光检测法筛选获得一株具有最高腈水解酶活性的突变株,该突变株对异丁基二腈具有较高选择性,能成功转化合成(3S)-3-氨基-5-甲基己酸,通过进一步反应可合成普瑞巴林。本课题组徐美珍等^[61]以筛选获得的赤霉菌(*G. intermedia*) WX12 为催化剂,以 3-异丁基戊二腈为底物进行转化所得产物(R)-3-氨基-5-甲基己酸,经霍夫曼重排反应可制备获得(R)-普瑞巴林,ee 值大于 99%。加巴喷丁也是一种新型抗癫痫药,它是 γ -氨基丁酸的衍生物,而 1-氰基环己烷乙酸是合成加巴喷丁的前体。Zhu 等^[62]发现大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110 腈水解酶 bll6402 能将 α,ω -二腈转化为 ω -氰基羧酸,为此,他们以该腈水解酶为催化剂,以 1-氰基环己烷乙酸为底物,成功合成了加巴喷丁的关键中间体 1-氰基环己烷乙酸。巴氯芬是一种手性药物,具有镇咳、抗癫痫、治疗顽固性呃逆、中风及脊髓损伤引起的疼痛、三叉神经痛等功效,徐美珍等^[61]采用赤霉菌(*G. intermedia*) WX12 立体选择性催化 3-(4-氯苯基)-戊二腈制备 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸,产率为 90%,产物经氰基不完全水解和霍夫曼重排反应后可得到巴氯芬,HPLC 鉴定为(S)构型的巴氯芬,ee 值 > 99% (图式 3)。



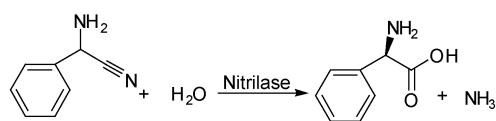
图式 3 巴氯芬的合成

Scheme 3 Synthesis of baclofen

5.4 药用氨基酸

氨基酸在医药上的关键作用正日益受到人们重视,应用范围也越来越广泛。采用腈水解酶介导的生物催化合成途径是药用氨基酸生产工业中的一条重要途径。作为药用氨基酸中间体原料,除天然氨基酸外,越来越多的非天然氨基酸也逐步开发出来。D-苯甘氨酸是合成多种抗生素的中间体,如氨苄青霉素和头孢氨苄等。文献报道鞘氨醇单胞菌(*S. wittichii*) RW1 重组腈水解酶能特异性水解苯胺基乙腈合成 D-苯甘氨酸(图式 4)^[14],采用水-1-辛醇的两相体系进行转化,在 25 °C, 100 mM 底物的情况下,通过 48 h 转化,最高产物收率为 81%, ee 值也保持在 95% 以上。Alonso 等^[63]也筛选获得了一株具有苯胺基乙腈水解能力的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) 10145,在采用苯甲腈进行诱导培养的情况下,相应的游离细胞在 30 min 内可将底物完全转化为 D-苯甘氨酸;不过他们分析起催化作用的酶系可能为腈水解酶或腈水合酶-酰胺酶体系。Jin 等^[64]采用基因挖掘获得的重组腈水解酶转化 2-氨基-4-甲硫基丁腈制备蛋氨酸;在 pH = 7.5 及 40 °C 下,300 mM 底物在 120 min 内即可完全转化生成相应氨基酸,为进一步提高催化剂利用效率,采用包埋法固定化细胞可持续操作 100 h 仍能残留 80% 酶活,最终蛋氨酸纯度和总产率分别为 99.1% 和 97%。Liang 等^[65]采用从土壤样品中筛选获得的红球菌(*Rhodococcus* sp.) G20 进行 β-氨基丙腈的生物转化制备 β-丙氨酸,采用响应面法优化了转化条件,在 30 °C 和 pH = 7.5 的条件下进行转化,1.29% (v/v) 的氨基丙腈能在约 80 min 内转化完全,生成 β-丙氨酸,同时反应过程中会生成适量丙氨酰胺,并且随着反应时间的推进其含量会逐渐降低,作者推

测该反应是由腈水合酶-酰胺酶体系或腈水解酶与腈水合酶-酰胺酶共同体系的作用完成。



图式 4 D-苯甘氨酸的生物合成

Scheme 4 Synthesis of D-phenylglycine

5.5 羟基乙酸

羟基乙酸,又称为乙醇酸,是 α-羟基酸家族中最简单的一种化合物,可用于制备生物降解材料及合成多种医用原料。以羟基乙腈为底物,采用腈水解酶进行羟基乙酸的生物合成在近十年来受到了较多关注^[66, 67],尤其 DuPont 公司开展了大量工作(图式 5)。



图式 5 羟基乙酸的生物合成

Scheme 5 Synthesis of glycolic acid

如 5.3 节所述,他们首先对敏捷食酸菌(*A. facilis*) 72W 腈水解酶的编码基因进行了重组表达^[58],发现该酶除对二腈具有较强选择性外,对于羟基乙腈也具有较高水解特异性。研究者通过基因突变的手段对该腈水解酶进行了蛋白质工程改造,以羟基乙腈为底物筛选获得一株比酶活相比野生酶提高 33 倍的突变株;为了增强催化剂的稳定、提高细胞的重复利用批次,对基因工程菌游离细胞进行了进一步的固定化操作,固定化细胞可重复利用 55 个批次,催化剂产率达到 1010 g 酸/g 细胞,初始及最终的体积产率计算为 46 g 酸/L/h 及 36 g 酸/L/h^[66]。在后续研究中,研究人员继续采用蛋白质工程手段对重组腈水解酶进行改造,通过组合突变的方式将催化剂对羟基乙腈的比酶活提高约 125 倍^[68]。

6 总结与展望

在过去数十年,尤其是近五年来生物催化已经得到迅猛发展,该领域发表的文献和建立的工艺正在快速增长;这种进步也使医药中间体及相关化学品的生物催化合成研究获得实惠。腈水解酶由于具备合成有机酸及氨基酸的功能,它在医药中间体合成等领域的应用前景正在逐步展现。腈水解酶的催化过程相比传统工艺在反应条件、能耗、污染控制等

方面具有一定的技术优势,符合原子经济性和绿色化学的发展方向。国际知名制药及化工公司如 Pfizer, DuPont, LONZA, BASF, Mitsubishi Rayon 等纷纷投入力量坚持开展腈水解酶的研究开发并取得了突出的理论进展和良好的应用效果^[2, 3, 60, 69, 70]。我国《“十二五”生物技术发展规划》也明确指出:要重点研究工业生物催化与转化,突破手性化工中间体等重大产品生物制造的产业化瓶颈,形成有机酸等产品制造的平台技术体系,形成手性酸等高附加值中间体的创新生物制造路线。这也为腈水解酶的应用研究开发提供了强劲的动力。然而,如何提高催化剂的酶活力、改善其对 pH/温度/有机溶剂/高底物及产物浓度的稳定性、拓宽底物谱,以最大程度的体现腈水解酶合成反应的独特优势,开拓更多新的腈水解酶应用于新的医药中间体的合成,是当前亟待解决的问题。针对这些问题,未来的研究重点将涵盖以下方面:(1)腈水解酶的分子改造。多数天然酶在催化和应用性能方面通常无法满足生产要求,为此可通过基因工程手段从分子层面对腈水解酶进行改造,改造方向重点包括酶活、副产物生成、底物谱等方面;另外,极端条件下的催化反应将逐步成为未来研究的热点之一,相应极端酶的需求势必增加,通过分子改造获得的耐热、耐酸碱、耐有机溶剂、耐高底物和产物浓度的腈水解酶将具备更有利的发展空间。改造手段主要包括理性设计、定向进化技术以及这两种方法相结合的技术;(2)腈水解酶的晶体结构研究。理性改造的前提是获得蛋白的空间结构,然而截至目前为止 PDB 数据库中仅报道了一个腈水解酶的晶体结构,腈水解酶蛋白结晶困难、晶体质量较差是影响其空间结构研究开展的主要因素,未来研究需在这方面进行更深入的探索;(3)新酶的挖掘。传统腈水解酶的获取主要以选择性筛选为主,该方法工作量大、周期长、总体效率偏低,且获得新酶的概率低,基因挖掘及宏基因组技术的发展为高效、快速地获取新的腈水解酶提供了良好的机遇;此外,一些新的简便灵敏的高通量筛选方法也有待建立,结合创新的筛选策略,如能直接通过大规模筛选获得工业应用所需特征的高效催化剂将极大节约酶制剂开发的成本;(4)真菌腈水解酶资源的开发。目前主流的腈水解酶研究工作主要围绕细菌腈水解酶展开,而真菌腈水解酶资源还远未得到开发,作为一类新型生物催化剂,真菌腈水解酶在

催化活力、立体选择性等方面具有一定优势,因此后续研究可关注真菌腈水解酶在医药中间体合成中的应用价值;(5)应用技术及工艺研究。由于具备可提高酶的稳定性、增加重复利用批次、降低催化剂成本的独特优势,固定化技术未来依然是腈水解酶工艺研究及应用技术开发的重点,更多应用于腈水解酶固定的新型固定化材料和固定化技术有待发掘;另外,除了分子层面的基因工程改造可提高腈水解酶催化剂的应用潜力外,生物转化过程调控及产酶水平优化对于工艺改进的作用仍然不可忽略。随着生物催化进入第三次发展浪潮以及人们对于腈水解酶的生理功能和实用价值认识的提升,有理由期待腈水解酶的发展必将进入一个崭新的阶段。

参考文献

- [1] Debabov V, Yanenko A. *Rev. J. Chem.*, 2011, 1 (4): 385.
- [2] Gong J S, Lu Z M, Li H, Shi J S, Zhou Z M, Xu Z H. *Microb. Cell Fact.*, 2012, 11: 142.
- [3] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. *Nature*, 2001, 409: 258.
- [4] Brady D, Beeton A, Zeevaert J, Kgaje C, Rantwijk F, Sheldon R A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 64 (1): 76.
- [5] Bornscheuer U T, Huisman G W, Kazlauskas R J, Lutz S, Moore J C, Robins K. *Nature*, 2012, 485 (7397): 185.
- [6] Reetz M T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135 (34): 12480.
- [7] Thimann K V, Mahadevan S. *Arch Biochem. Biophys.*, 1964, 105 (1): 133.
- [8] Robinson W G, Hook R H. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239: 4257.
- [9] Kobayashi M, Shimizu S. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, 120 (3): 217.
- [10] Velankar H, Clarke K G, Preez R d, Cowan D A, Burton S G. *Trends Biotechnol.*, 2010, 28 (11): 561.
- [11] Wang H, Li G, Li M, Wei D, Wang X. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 30(1): 245.
- [12] Zhu X Y, Gong J S, Li H, Lu Z M, Shi J S, Xu Z H. *Chem. Pap.*, 2014, 68 (6): 739.
- [13] Qiu J, Su E, Wang W, Wei D. *Catal. Commun.*, 2014, 51: 19.
- [14] Qiu J, Su E, Wang W, Wei D. *Tetrahedr. Lett.*, 2014, 55 (8): 448.
- [15] Pai O, Banoth L, Ghosh S, Chisti Y, Banerjee U C. *Process Biochem.*, 2014, 49 (4): 655.
- [16] Oliveira J, Selegim M, Porto A. *Mar. Biotechnol.*, 2014, 16 (2): 156.
- [17] Liu Z Q, Zhang X H, Xue Y P, Xu M, Zheng Y G. *J. Agri. Food Chem.*, 2014, 62(20): 4685.
- [18] Li H, Yang T, Gong J S, Xiong L, Lu Z M, Li H, Shi J S, Xu

- Z H. *Bioprocess Biosyst. Eng.* , 2014, 38(1) : 189.
- [19] He Y C, Wu Y D, Pan X H, Ma C L. *Biotechnol. Lett.* , 2014, 36 (2) : 341.
- [20] Bhatia S K, Mehta P K, Bhatia R K, Bhalla T C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2014, 98 (1) : 83.
- [21] Zhu X Y, Gong J S, Li H, Lu Z M, Zhou Z M, Shi J S, Xu Z H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , 2013, 97: 175.
- [22] Yoshida T, Mitsukura K, Mizutani T, Nakashima R, Shimizu Y, Kawabata H, Nagasawa T. *Biotechnol. Lett.* , 2013, 35 (5) : 685.
- [23] Xue Y P, Xu M, Chen H S, Liu Z Q, Wang Y J, Zheng Y G. *Org. Process Res. Dev.* , 2013, 17 (2) : 213.
- [24] Kumar V, Bhalla T C. *Biocatal. Biotransfor.* , 2013, 31 (1) : 42.
- [25] Zhang C S, Zhang Z J, Li C X, Yu H L, Zheng G W, Xu J H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2012, 95 (1) : 91.
- [26] Sharma N, Sharma M, Bhalla T. *AMB Express*, 2012, 2 (1) : 25.
- [27] Zhang Z J, Pan J, Liu J F, Xu J H, He Y C, Liu Y Y. *J. Biotechnol.* , 2011, 152 (1/2) : 24.
- [28] Sharma N, Sharma M, Bhalla T. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* , 2011, 38 (9) : 1235.
- [29] Gong J S, Lu Z M, Shi J S, Dou W F, Xu H Y, Zhou Z M, Xu Z H. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 2011, 165 (3/4) : 963.
- [30] Schreiner U, Hecher B, Obrowsky S, Waich K, Klempier N, Steinkellner G, Gruber K, Rozzell J D, Glieder A, Winkler M. *Enzyme Microb. Technol.* , 2010, 47 (4) : 140.
- [31] Kumar S, Mohan U, Kamble A L, Pawar S, Banerjee U C. *Bioresour. Technol.* , 2010, 101 (17) : 6856.
- [32] Rustler S, Stolz A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2007, 75: 899.
- [33] 曹明乐 (Cao M L), 姜兴林 (Jiang X L), 张海波 (Zhang H B), 咸漠 (Xian M), 徐鑫 (Xu X), 刘炜 (Liu W). *生物过程 (Bioprocess)* , 2012, 2: 70.
- [34] 赵素娟 (Zhao S J), 秦斌 (Qin B), 马小双 (Ma X S), 陈会来 (Chen H L), 贾娴 (Jia X), 游松 (You S). *沈阳药科大学学报 (J. Shenyang Pharm. Univ.)* , 2011, 28 (3) : 226.
- [35] Wu Y, Gong J S, Lu Z M, Li H, Zhu X Y, Li H, Shi J S, Xu Z H. *J. Basic Microbiol.* , 2013, 53 (11) : 934.
- [36] Xue Y P, Xu S Z, Liu Z Q, Zheng Y G, Shen Y C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* , 2011, 38 (2) : 337.
- [37] Oliveira J, Mizuno C, Seleglim M, Javaroti D, Rezende M, Landgraf M, Sette L, Porto A. *Mar. Biotechnol.* , 2013, 15 (1) : 97.
- [38] 曹明乐 (Cao M L), 姜兴林 (Jiang X L), 张海波 (Zhang H B), 咸漠 (Xian M), 徐鑫 (Xu X), 刘炜 (Liu W). *应用与环境生物学报 (Chin. J. Appl. Environ. Biol.)* , 2013, 19 (2) : 346.
- [39] Stalker D M, McBride K E. *J. Bacteriol.* , 1987, 169 (3) : 955.
- [40] Gong J S, Li H, Zhu X Y, Lu Z M, Wu Y, Shi J S, Xu Z H. *PLoS ONE*, 2012, 7 (11) : e50622.
- [41] Gong J S, Lu Z M, Li H, Zhou Z M, Shi J S, Xu Z H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2013, 97 (15) : 6603.
- [42] DeSantis G, Zhu Z, Greenberg W A, Wong K, Chaplin J, Hanson S R, Farwell B, Nicholson L W, Rand C L, Weiner D P, Robertson D E, Burk M J. *J. Am. Chem. Soc.* , 2002, 124 (31) : 9024.
- [43] Bayer S, Birkemeyer C, Ballschmiter M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2011, 89 (1) : 91.
- [44] Qiu J, Su E Z, Wang H L, Cai W W, Wang W, Wei D Z. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 2014, 173(2) : 365.
- [45] Kaplan O, Bezouška K, Malandra A, Veselá A, Petříčková A, Felsberg J, Rínágelová A, Křen V, Martínková L. *Biotechnol. Lett.* , 2011, 33 (2) : 309.
- [46] DeSantis G, Wong K, Farwell B, Chatman K, Zhu Z, Tomlinson G, Huang H, Tan X, Bibbs L, Chen P, Kretz K, Burk M J. *J. Am. Chem. Soc.* , 2003, 125 (38) : 11476.
- [47] Liu Z Q, Baker P J, Cheng F, Xue Y-P, Zheng Y-G, Shen Y-C. *PLoS ONE*, 2013, 8 (6) : e67197.
- [48] Kiziak C, Stolz A. *Appl. Environ. Microbiol.* , 2009, 75 (17) : 5592.
- [49] Petříčková A, Sosedov O, Baum S, Stolz A, Martínková L. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , 2012, 77: 74.
- [50] 温飞鹏 (Wen F P), 张贤士 (Zhang X T), 徐金龙 (Xu J L), 程美琴 (Cheng M Q), 邓小聪 (Deng X C), 钟起玲 (Zhong Q L). *应用化工 (Appl. Chem. Ind.)* , 2010, 39 (10) : 1552.
- [51] Mathew C D, Nagasawa T, Kobayashi M, Yamada H. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1988, 54 (4) : 1030.
- [52] Maksimova Y G, Vasilyev D M, Ovechkina G V, Maksimov A Y, Demakov V A. *Appl. Biochem. Microbiol.* , 2013, 49 (4) : 347.
- [53] Yamamoto K, Oishi K, Fujimatsu I, Komatsu K. *Appl. Environ. Microbiol.* , 1991, 57 (10) : 3028.
- [54] Banerjee A, Dubey S, Kaul P, Barse B, Piotrowski M, Banerjee U. *Mol. Biotechnol.* , 2009, 41 (1) : 35.
- [55] Zhang Z J, Pan J, Li C X, Yu H L, Zheng G W, Ju X, Xu J H. *Bioprocess Biosyst. Eng.* , 2014, 37(7) : 1241.
- [56] Ni K, Wang H, Zhao L, Zhang M, Zhang S, Ren Y, Wei D. *J. Biotechnol.* , 2013, 167 (4) : 433.
- [57] Ress-Loschke M, Friedrich T, Hauer B, Mattes R, Engels D. *US 6869783*, 2005.
- [58] Chauhan S, Wu S, Blumerman S, Fallon R D, Gavagan J E, DiCosimo R, Payne M S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 2003, 61 (2) : 118.
- [59] Roy B N, Singh G P, Lathi P S, Agrawal M K. *Indian J. Chem.* , 2012, 51: 1470.
- [60] Xie Z, Feng J, Garcia E, Bernett M, Yazbeck D, Tao J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* , 2006, 41 (3/4) : 75.
- [61] 徐美珍 (Xu M Z), 任杰 (Ren J), 龚劲松 (Gong J S), 董文玥

- (Dong W Y), 吴洽庆(Wu Q Q), 许正宏(Xu Z H), 朱敦明(Zhu D M). 生物工程学报(Chin. J. Biotechnol.), 2013, 29 (1): 31.
- [62] Zhu D, Mukherjee C, Biehl E R, Hua L. Adv. Synth. Catal., 2007, 349 (10): 1667.
- [63] Alonso F O M, Oestreich E G, Antunes O A C. Braz J Chem. Eng., 2008, 25 (1): 1.
- [64] Jin L Q, Li Z T, Liu Z Q, Zheng Y G, Shen Y C. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2014, 41 (10): 1479.
- [65] Liang L Y, Zheng Y G, Shen Y C. Process Biochem., 2008, 43 (7): 758.
- [66] Panova A, Mersinger L J, Liu Q, Foo T, Roe D C, Spillan W L, Sigmund A E, Ben-Bassat A, Wagner L W, O'Keefe D P, Wu S, Petrillo K L, Payne M S, Breske S T, Gallagher F G, DiCosimo R. Adv. Synth. Catal., 2007, 349 (8/9): 1462.
- [67] He Y C, Xu J H, Su J H, Zhou L. Appl. Biochem. Biotechnol., 2010, 160 (5): 1428.
- [68] Wu S, Fogiel A J, Petrillo K L, Jackson R E, Parker K N, DiCosimo R, Ben-Bassat A, O'Keefe D P, Payne M S. Biotechnol. Bioeng., 2008, 99 (3): 717.
- [69] Zaks A. Curr. Opin. Chem. Biol., 2001, 5 (2):
- [70] Vejvoda V, Kubác D, Davidová A, Kaplan O, Sulc M, Sveda O, Chaloupková R, Martínková L. Process Biochem., 2010, 45 (7): 1115.