

综述



张洪斌, 教授、博士生导师, 研究方向为生物酶工程及分子进化、多糖的生物合成与综合利用方向、手性化合物的定向生物合成。酶工程与生物制药课题组成立于2006年, 在新酶创制与关键酶筛选、酶催化技术及生物药物创制方面建立了完善的科研平台。团队致力于现代酶工程技术, 借助分子生物学与特定的筛选技术解决药物合成工艺中关键酶的创制及其催化机理, 并利用酶催化技术进行药物生物合成研究, 为新药发现、绿色制药工艺创新提供技术支撑。

转氨酶应用于非天然氨基酸手性合成的研究进展

刘嘉荔, 张鑫, 杨静文, 张洪斌*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230009)

摘要: 氨基酸是蛋白质的重要组成部分, 除常见氨基酸以外, 还有成分微量但发挥巨大作用的氨基酸, 又称非天然氨基酸。其中手性非天然氨基酸通常作为抗生素、农药等的中间体被应用于现代医药和食品领域, 因此对手性氨基酸的开发和生产具有巨大的应用价值。基于对非天然氨基酸的研究, 本文总结了非天然氨基酸尤其是手性氨基酸苯甘氨酸的合成及应用, 并对相关方法的优劣性进行讨论, 最后对手性氨基酸的未来发展前景进行展望。

关键词: 非天然氨基酸; 苯甘氨酸; 酶法合成; 转氨酶

Research progress of transaminases in the chiral synthesis of unnatural amino acids

LIU Jiali, ZHANG Xin, YANG Jingwen, ZHANG Hongbin*

(College of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Amino acids are important components of proteins, and in addition to common amino acids, there are also amino acids, also known as unnatural amino acids, that play a great role in trace components. Among them, chiral unnatural amino acids are usually used as intermediates of antibiotics, pesticides and other intermediates in the field of modern medicine and food, so the development and production of chiral amino acids have a significant value of application. The paper summarized the synthesis and application of non-natural amino acids, especially the chiral amino acid phenylglycine, explored the advantages and disadvantages of the method and finally looked forward to the future development prospect of chiral amino acids.

Key Words: unnatural amino acids; phenylglycine; enzymatic synthesis; transaminases

收稿日期: 2024-04-29

基金项目: 安徽省制药工程教学团队项目(2021jxtd227); 安徽省自然科学基金面上项目(2308085MC110)

第一作者: E-mail: 794698046@qq.com

*通信作者: E-mail: hbzhang@hfut.edu.cn

蛋白质在生物体基因翻译表达、机制调节、免疫应答等过程中发挥重要作用。蛋白质通常由常见的20种氨基酸组成, 但科学家们在生物体中发现了许多含量低但能发挥特异性功能的氨基酸, 称为非天然氨基酸。常见氨基酸和种类繁多的非天然氨基酸在不同领域中均具有重要作用。

非天然氨基酸的生产依靠化工技术得到实现, 但伴随对生物酶的挖掘和发展, 转氨酶逐步进入大众视野。其中转氨酶的不对称合成使非天然氨基酸的生成更加简单、有效, 尤其是转氨酶高效的特异性、反应中辅酶再生等优势, 有利于作为工业生物催化剂被使用。当前对手性氨基酸的生物酶催化研究主要集中在多酶级联反应、不对称合成中, 通过转氨酶催化氨基在供体和受体之间的转化而达到合成手性氨基酸的目的, 如天冬氨酸转氨酶催化苯甲酰甲酸和L-谷氨酸以形成L-苯甘氨酸^[1]。针对手性氨基酸的合成还有巨大的研究空间, 尤其是针对转氨酶的蛋白质改造以及合成方式的研究。本文总结了非天然氨基酸的合成方式及转氨酶的分类, 为后续转氨酶应用于非天然氨基酸合成等方面的研究提供理论基础。

1 氨基酸

氨基酸的发现可以追溯到法国科学家发现并分离出天冬酰胺^[2]后, 常见的20种氨基酸在科学家的探究和发现中逐步进入大众视野。作为蛋白质结构的重要组成部分, 氨基酸在生物体内发挥着不可替代的作用。

1.1 氨基酸的类别

随着科学技术的进一步发展, 科学家发现自然界中的氨基酸种类并不局限于常见的20种氨基酸。反而, 有许多不参与蛋白质合成的氨基酸分子在生命活动中发挥着十分重要的作用, 这些氨基酸被定义为非蛋白质类氨基酸, 又称非天然氨基酸^[3]。因此, 氨基酸分为天然氨基酸和非天然氨基酸两种类型。

1.2 非天然氨基酸

非天然氨基酸的获得方式通常与常见天然氨基酸不同, 常见天然氨基酸又称蛋白质氨基酸可以通过生物合成直接获取。而非天然氨基酸不存在于天然多肽链中, 它们通常是植物、真菌等的次

级代谢产物, 通常通过天然氨基酸或相关化合物通过化学修饰的方式来获得^[4]。根据文献报道, 目前已有超过800种非天然氨基酸被发现, 它们具有可转化的官能团, 通常被用于现代新型药物或新型材料的生产中^[5-7]。研究发现, 它们虽含量极少, 但效果不可替代, 如作为药物前体、生物光谱学^[8]、药物探针修饰^[9]等在生物体发挥重要调节作用。

1.3 苯甘氨酸的介绍及应用

非天然氨基酸中手性化合物在日常生活中占据十分重要的角色, 尤其在药品的生产中, 其作为药物中间体发挥着巨大的作用。如苯甘氨酸又称为苯基甘氨酸, 是手性芳香族 α -氨基酸, 由于羧酸分子中 α -碳被氨基取代而得名。作为非天然氨基酸, 苯甘氨酸的应用也十分广泛。

1.3.1 新型医药、食品领域

苯甘氨酸通常可以作为广谱抗生素如氯霉素、青霉素等药物的中间体, 还能用于合成L-氯吡格雷的中间体。L-氯吡格雷是治疗动脉粥样化的抗血栓药物, 能预防心肌梗死^[10]。不仅如此, 有研究发现, L-苯甘氨酸还可以作为抗癌药物紫杉醇的前体, 用于构建金属氨基酸复合物抗生素如铱-L-苯甘氨酸抗生素复合药物, 进行分子治疗和靶向鉴定的工作^[11-14]。除此之外, 在食品领域中利用苯甘氨酸的衍生物生产出阿斯巴甜S-天冬氨酰-N-苯甘氨酸甲酯, 作为食品甜味剂使用^[15]。

1.3.2 生物仿生材料

苯甘氨酸、对羟基苯甘氨酸、3,5-二羟基苯甘氨酸作为非核糖体肽生物合成的基石, 已广泛应用于新型药物的制造中^[16-18], 如利用苯甘氨酸生产新型原始毒素衍生物^[19]。在生物材料制作和仿生传感器^[20]等方面苯丙氨酸和苯甘氨酸组成的二肽可自组装成纳米带, 该纳米带受到苯丙氨酸手性控制和苯甘氨酸空间位阻控制, 可作为生物材料或手性识别进行使用^[21]。

2 非天然氨基酸的生产方法

目前非天然氨基酸的生产和使用已经十分普遍, 其生产方式主要依赖于化工合成和生物酶的次生代谢技术。如 γ -氨基丁酸是谷氨酸脱羧产物, 通过来自短乳芽孢杆菌的基因*LbGAD*整合至枯草

芽孢杆菌中，完成从味精中获取 γ 氨基丁酸的工程化生产^[22,23]；高丙氨酸常用于抗癫痫药物和抗结核化合物的合成，高丙氨酸的合成通常利用转氨酶将 α -酮酸胺化为L-高丙氨酸或者通过酰化酶分离外消旋混合物完成^[24]。苯甘氨酸当前在非天然氨基酸中是研究热点，苯甘氨酸及其衍生物的应用十分广泛，因此针对苯甘氨酸的生产也越来越受重视。苯甘氨酸的生产可追溯到二十世纪60年代，随着工业化的发展，从无机化合物中提取非天然氨基酸的技术被开发和应用，因此从廉价原料中提取L-苯甘氨酸的技术路线也建立起来。初期的生产方式通常以化学合成法为主，包括氰化钠法、苯乙醛、氯仿法、不对称合成法等，其生产原料均为廉价的化学材料，为L-苯甘氨酸的工业化生产提供了重要的渠道。随着酶的开发利用，通过生物酶生产苯甘氨酸的实验方法也逐渐得到完善。

2.1 氰化钠合成法

初始化学合成苯甘氨酸的方法是氰化钠法，其合成原料为苯甲醛、碳酸氢铵以及过量10%氰化钠(或氰化钾)。合成步骤为：经Bucherer-Begrs反应^[25]获得苯海茵，加压水解后获得苯甘氨酸；在获得的苯甘氨酸溶液中加入50%硫酸酸化中和pH后生成苯甘氨酸。

具体的实验操作如图1所示。以苯甲醛、碳酸氢铵以及氰化钠为原料制备苯甘氨酸^[26,27]，其反应过程是将工业氰化钠溶液与碳酸氢铵水溶液首先混合处理，在混合液中逐步倒入苯甲醛的乙醇溶液，在常温下反应3~5小时以保证各底物之间均匀混合。接着，通过加入压力釜中对反应液进行升温处理(70~90 °C反应3小时，110 °C反应4小时)，获得初产物。初产物通过氢氧化钠进行加热回流

处理，由于初产物中含铁量较高导致反应液的颜色较深，需利用活性炭脱色处理，再通过盐酸酸化和乙醇重结晶等手段最终获得纯化产品。通过以上化学方法获得的苯甘氨酸产率达到72.8%，纯度达到98%。

2.2 乙醛酸法

以氰化钠为底物进行化学合成可获得苯甘氨酸。虽然产量和纯度较为可观，但是工艺过程繁琐，反应温度要求较高，氰化钠作为剧毒试剂在操作过程中存在巨大危险。因此，科学家们尝试以乙醛酸作为底物，在酸性条件下，使用乙醛酸与铵盐发生缩合反应，产物再与烷基苯进一步反应生成N-酰基苯甘氨酸，再经氨化反应生成N-乙酰基苯甘氨酸铵盐。铵盐分别与D-苯甘氨酸铵盐以及DL-苯甘氨酸铵盐拆分诱导结晶，最终生成苯甘氨酸铵盐；苯甘氨酸铵盐通过盐酸酸化并加热回流，最终调节pH值到5，通过分离纯化可获得苯甘氨酸，如图2所示。以乙醛酸为底物大大降低了工业原料成本，但仍有许多不足，如实验周期长、对起始原料浓度的要求高等^[28]。

2.3 氯仿合成法

科学家们在实验的改善和尝试中发现，氯仿可替代氰化钠作为合成苯甘氨酸的底物^[29]。如图3所示，以氯仿和苯甲醛为底物，在溴化四正丁基的催化下首先生成苯乙醛酸，通过浓盐酸酸化以及乙醚有机萃取后获得淡黄色粗制品；使用氢氧化钠制备碱性溶液环境，加入粗制品溶解后添加尿素，在80 °C高温环境中发生化学反应环合形成苯乙内酰脲，在氢氧化钡存在的反应环境中发生水解反应，最终通过浓盐酸酸化以及乙酸水溶液重结晶后制得苯甘氨酸，最终收率达到81%。虽然氯

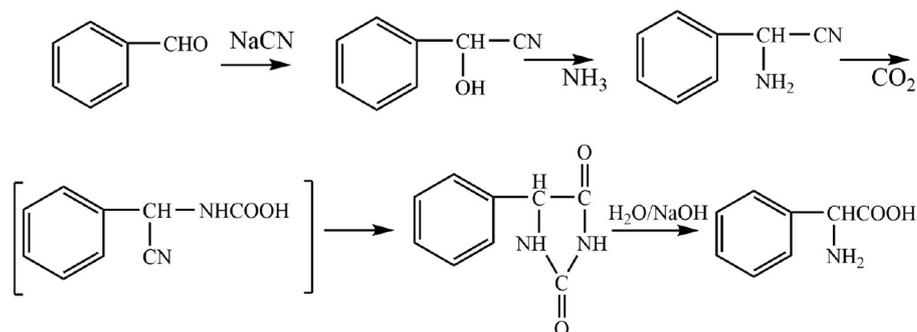


图1 氰化钠法合成L-苯甘氨酸

仿可以替代氰化钠用于合成苯甘氨酸, 但该过程需要添加溴化四正丁基作为相转移催化剂以及不同程度的纯化、萃取、酸化和重结晶, 实验过程十分繁琐且成本较高。

2.4 生物酶法合成苯甘氨酸

生产苯甘氨酸的底物不仅有苯乙醛酸, 苯乙酮酸也可以在亮氨酸脱氢酶以及甲酸脱氢酶的级联作用下进行转化, 积极地促进L-苯甘氨酸的产生。如图4所示, 甲酸脱氢酶可将甲酸氧化成二氧化碳和水, 同时将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD^+ 还原成 NADH , 在 NADH 再生中具有重要的作用。在亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶的级联作用下, 苯乙酮酸直接合成L-苯甘氨酸, 伴随 NADH 被甲酸脱氢酶还原, 在反应中保证苯乙酮酸被大量消耗, 最终转化率高达90.46%, 并有82.07 g/L的L-苯甘氨酸产量^[30]。

3 转氨酶研究与应用

近年来, 手性药物发展迅速, 对手性氨基酸的需求也急剧增加。随着转氨酶被发掘, 实现了生物酶法合成手性氨基酸的构想。转氨酶具有高酶活性、高选择性等特征, 为手性氨基酸的合成提

供了极大的便利和可改造空间。

3.1 转氨酶的发现与挖掘

生物酶法的顺利合成说明, 酶催化生成苯甘氨酸技术具有可行性。脱氢酶的级联使用可以将苯甲酰甲酸转化为L-苯甘氨酸, 转氨酶也有类似的功能。转氨酶、胺脱氢酶、亚胺还原酶、氨裂解酶、单胺氧化酶等生物酶常用于手性胺的合成。

用于手性氨基酸合成的转氨酶(transaminase, EC2.6.1)又称为氨基转移酶, 它介导氨基从氨基供体向受体如酮酸、酮等立体选择性转移以形成手性胺或新的酮酸^[31]。不同类型的转氨酶逐渐被挖掘、发现和定义, 因此依据类别的不同, 研究学者将转氨酶分为四种类型, 其中磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)依赖性的转氨酶有第I和IV类转氨酶^[32], 如表1所示。经过近三十年的研究, 转氨酶已被证实可作为合成无机化合物十分有效的生物催化剂。

3.2 转氨酶的作用机制

转氨酶的催化机制遵循“乒乓机制”。首先, 活性中心催化Lys残基的氨基与PLP的醛基通过形成内部醛亚胺(I)的形式相连, 然后由氨基供体的氨基取代Lys的氨基与PLP形成一个外部醛亚胺

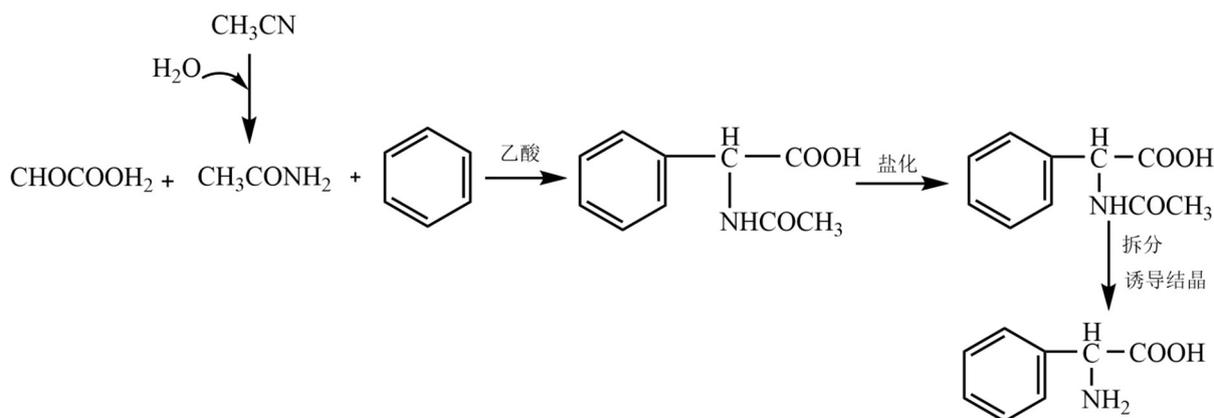


图2 乙醛酸法合成L-苯甘氨酸

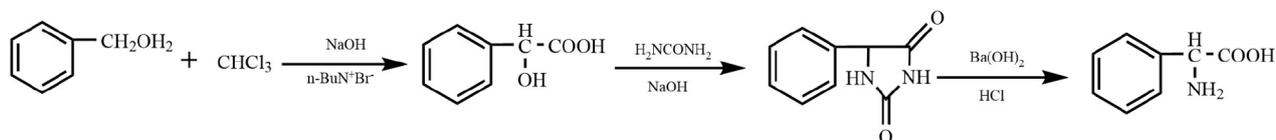


图3 氯仿合成苯甘氨酸

(II)。在催化残基Lys作用下发生质子转移，先后形成醌型结构中间体(III)和酮亚胺中间体(IV)。最后，由酮亚胺中间体水解生成产物酮和5'-磷酸吡哆胺(PMP)。第二步反应将PMP的氨基转移至氨受体上生成手性胺，同时完成辅酶循环再生。这一步反应中当催化残基Lys位于醌型结构中间体的si面(相对于PLP的C4')时(S型转氨酶)主要生成S型手性胺，而位于re面时(R型转氨酶)主要生成R型手性胺^[38]。如来源于节杆菌属的 ω -转氨酶^[39]在PLP的辅助下，将西洛多辛中间体酮通过转氨催化生成西洛多辛中间体。简而言之，有PLP的“乒乓机制”动力学反应通常分为以下两步：(1)氨基与PLP反应形成磷酸吡哆胺PMP，该过程释放相应的酮酸产物；(2)氨基受体与PMP结合，释放相应转氨产物，通常是不同类型的氨基酸等，此时PMP经转化再次生成PLP。在整个转氨的过程中，PLP起到提供电子传递、促进新键形成的作用。随着研究的深入，科学家们发现，D苯甘氨酸转氨酶具有独特的底物特异性以及对映体的选择性，逐渐取代了化工手法生产手性苯甘氨酸的工艺路线。

3.3 常见的氨基转移酶

氨基酸转氨酶的众多种类中，L-天门冬氨酸氨基转移酶(L-AspAT)作为PLP依赖性生物酶的最大家族，是第一个被研究的。除此以外，苯甘氨酸转氨酶作为PLP折叠第IV类转氨酶，在转氨反应中也引起越来越多的关注。PLP作为辅酶的转氨酶通常以二聚体或四聚体的形式存在，并在反应中行使“乒乓机制”催化并促进氨基的转移。

3.3.1 L-天门冬氨酸氨基转移酶

天冬氨酸转氨酶主要来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、志贺氏菌(*Shigella boydii*)、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等，对其的研究可以追溯到1963年。当时，人们发现天门冬氨酸氨基转移酶可以将L-天门冬氨酸转化为L-丙氨酸和CO₂，但由于酶活性较低，对其转氨效果研究还不够深入。天冬氨酸转氨酶作为PLP依赖性的氨基转移酶，属于PLP折叠类I类转氨酶。该酶在蛋白质表达结构上也是以同源二聚体的形式存在，如图5所示。每个亚基分为大小两个结构域，大结构域为第49-325位氨基酸，由 α -螺旋和 β -折叠

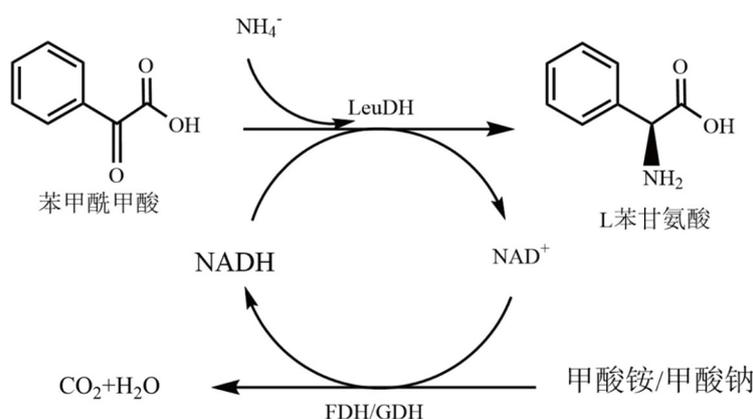


图4 亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶级联反应生成苯甘氨酸

表1 PLP依赖性转氨酶分类

类型	转氨酶特征
折叠I类	最大的PLP依赖性转氨酶家族，如氨基酸脱羧酶、变位酶、裂解酶等。酶蛋白三维结构通常由七链 β 折叠形成的N末端以及三-四链形成 β 折叠或 α 螺旋形成的C末端组成，在蛋白质形态上通常以同源二聚体或四聚体形式出现以发挥活性。活性位点上的小结构域具有来自N端和C端的残基 ^[33]
折叠IV类	具有一个C端六链 β 桶核心结构域、一个N端小结构域和Lys形成的LLP。与折叠I类类似，IV类转氨酶在转氨过程中将原始手性保持在C α 位置 ^[34] 。该类型转氨酶主要有三种类型：支链氨基酸转移酶(BCATs, EC 2.6.1.42)：催化支链氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸上的氨基转移至 α 酮戊二酸或丙酮酸 ^[35] ；D氨基酸转移酶(DAATs, EC 2.6.1.21)：可逆选择性促进D型氨基酸的生成或转化 ^[36] ；丙酮酸氨基转移酶(R-TAs, EC 2.6.1.X)：催化芳香族和脂肪族(R)-伯胺的转氨反应 ^[37]

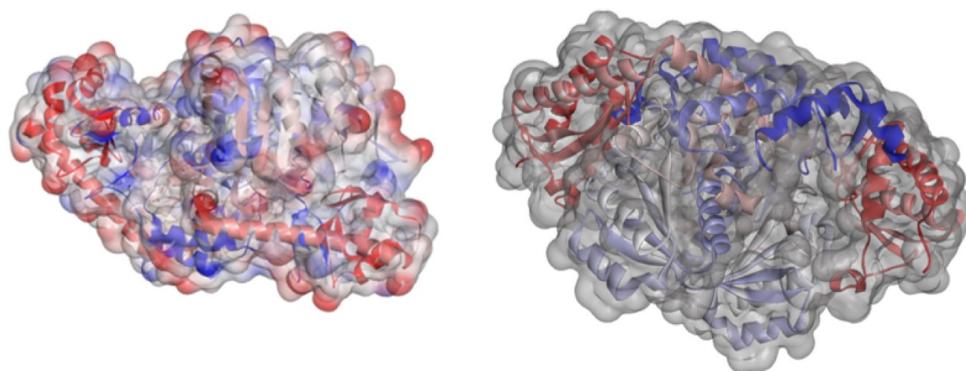


图5 天冬氨酸转氨酶和苯甘氨酸转氨酶的蛋白三维结构

组成, β -折叠位于中间位置, 两侧分布着 α -螺旋。小结构则由N末端到第48位氨基酸以及第326位氨基酸到C末端两部分组成。N端为 α - β 组成形式, 而C端则是 β -折叠被 α -螺旋包裹形成的类似 α - β - α 的三明治形式^[1]。

3.3.2 苯甘氨酸转氨酶

苯甘氨酸转氨酶(AAQ82900.1)也是一类PLP依赖性的氨基转移酶, 属于PLP折叠类第IV类转氨酶^[40]。1997年, 由Walton等^[41]在土壤恶臭假单胞菌中发现并分离出来。进一步研究发现, D-苯甘氨酸转氨酶同样受到PLP的影响, 在PLP的辅助下可将特定的D-苯基甘氨酸或对羟基苯基甘氨酸催化并与相应酮酸发生转氨反应。伴随晶体解析D-苯甘氨酸转氨酶的结构也被解析出来。如图5所示, 从结构上来看, D-苯甘氨酸转氨酶由同源二聚体组成, 属于IV类转氨酶, 单体由大小两个结构组成: 大结构由9个 α 螺旋和7个 β 折叠组成, 小结构称为N端和C端。N端部分(1-73氨基酸)为 α 1/ α 2包裹 β 1-3的折叠片。C端部分则是 α 12-15包裹 β 11-13的三明治 α - β - α 形式。

苯甘氨酸转氨酶通常有两个结合口袋, 分别对应不同的结合底物。羧酸结合口袋因靠近PLP中的磷酸基团而被称为P口袋, 通常它结合氨基酸底物中的羧酸基团; 另一个侧链结合口袋由于靠近PLP中的3'-O又被称为O口袋, 通常它的作用是结合L-谷氨酸中的 γ -羧酸侧链或氨基底物中的中性或带电侧链。D-苯基甘氨酸的苯基侧链结合在与谷氨酸的 α -羧酸基团结合的羧酸袋中, 而D-苯基甘氨酸的 α -羧酸结合在与L-谷氨酸的 γ -羧酸基团结合的侧链袋中。因此, 苯甘氨酸转氨酶结合D-苯甘氨酸

和L-谷氨酸可能需要羧酸盐和侧链结合袋进行结构重排, 而大多数其他转氨酶只需要侧链结合袋重排^[42]。

3.4 生物酶法合成苯甘氨酸

随着对自然界中代谢活动的进一步挖掘, 酶蛋白逐步进入科学研究的视野, 模拟生物代谢进化的过程来获得非天然氨基酸的方法也逐步建立。尤其是近年来, 伴随着生物酶技术的发展, 利用生物酶法合成苯甘氨酸已成为研究热点。针对苯甘氨酸的生物酶法催化路线通常是以“一锅式”级联反应完成手性氨基酸合成^[43-46]。L-苯甘氨酸作为非天然类氨基酸, 最初是在二十世纪六十年代通过来源于链霉菌中的肽类抗生素维吉尼霉素S, 经过水解并通过质谱和晶体解析发现的^[47]。直到二十世纪初, 链霉菌中关于L-苯甘氨酸生物合成的基因才被鉴定出来^[17,48]——来源于原始链霉菌中的*pglA*、*pglB*、*pglC*、*pglD*和*pglE*合成基因簇参与了L-苯甘氨酸的合成。它们通过反应将起始底物苯丙酮酸变为苯甲酰甲酸辅酶A, 最终在*pglE*的作用下生成L-苯甘氨酸, 如图6所示。该合成路线在反应96小时后能在反应液中检测到L-Phg的生成浓度达到1.6 $\mu\text{g/L}$ 。这一技术路线的顺利进行也为后续通过酶的级联反应生成L-苯甘氨酸奠定了理论基础。

以来源于链霉素的合成基因簇可以顺利将苯丙酮酸转化为L-苯甘氨酸为灵感, 不同的底物被应用于检测苯甘氨酸生成的实验中。随着科学技术的发展, 越来越多不同类型的酶被挖掘并应用于手性氨基酸的合成。如图7所示, 扁桃酸消旋酶和扁桃酸脱氢酶可以通过实验设计在级联反应中生成左旋苯甘氨酸, 实验路线为来源于放射性农杆菌

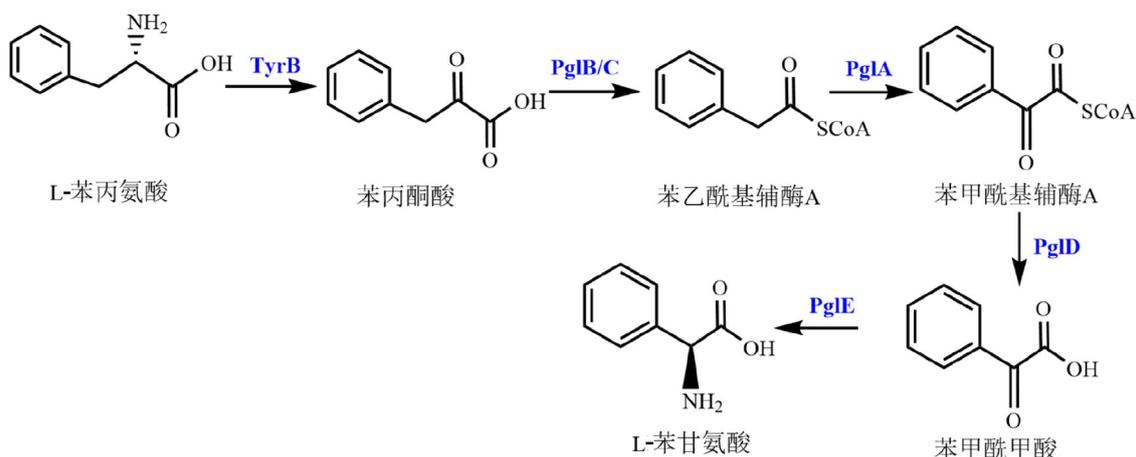


图6 链霉素基因簇合成L-苯甘氨酸

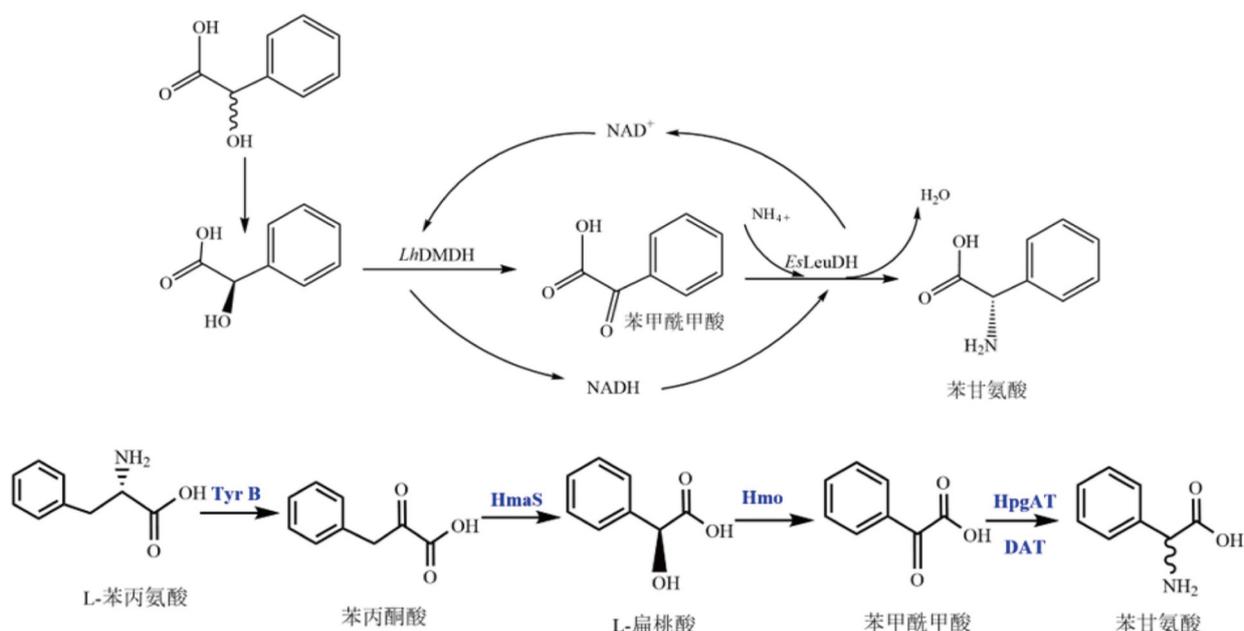


图7 扁桃酸级联反应生成L-苯甘氨酸

的扁桃酸消旋酶(ArMR)对外消旋扁桃酸进行转化生成D-扁桃酸,在哈比南乳杆菌扁桃酸脱氢酶的作用下获得苯乙醛酸。苯乙醛酸作为底物生成不同手性的苯甘氨酸通常有两种思路:(1)在亮氨酸脱氢酶以及辅酶NADH的环境下生成L-苯甘氨酸,或者在对羟基苯甘氨酸转移酶的作用下生成L-苯甘氨酸;(2)苯乙醛酸在D-苯甘氨酸转移酶的作用下生成D-苯甘氨酸^[49,50]。

天冬氨酸转氨酶可利用苯甲酰甲酸和L-天冬氨酸发生转氨反应,生成产物与来源于链霉菌的苯甘氨酸转氨酶相似,产物均为L-型苯甘氨酸^[51]。来

源于*Pseudomonas stutzeri*的苯甘氨酸转氨酶利用苯甲酰甲酸和L-谷氨酸作为底物进行转氨反应,生成D-苯甘氨酸和酮戊二酸,同时还能发生逆转氨反应,将D-苯甘氨酸与 α 酮戊二酸作为底物逆转氨生成苯甲酰甲酸和L-谷氨酸。而来源于*Streptomyces pristinaespiralis*的苯甘氨酸转氨酶PglE可以利用苯乙醛酸和L-苯丙氨酸催化生成L-苯甘氨酸,此时L-苯丙氨酸作为氨基供体,产物为L-型苯甘氨酸^[40-42]。还可以利用亮氨酸拉链自组装技术,将亮氨酸拉链基因融合至转氨酶基因的两端,通过体外自组装连接将两个转氨酶连接在一起(图8),

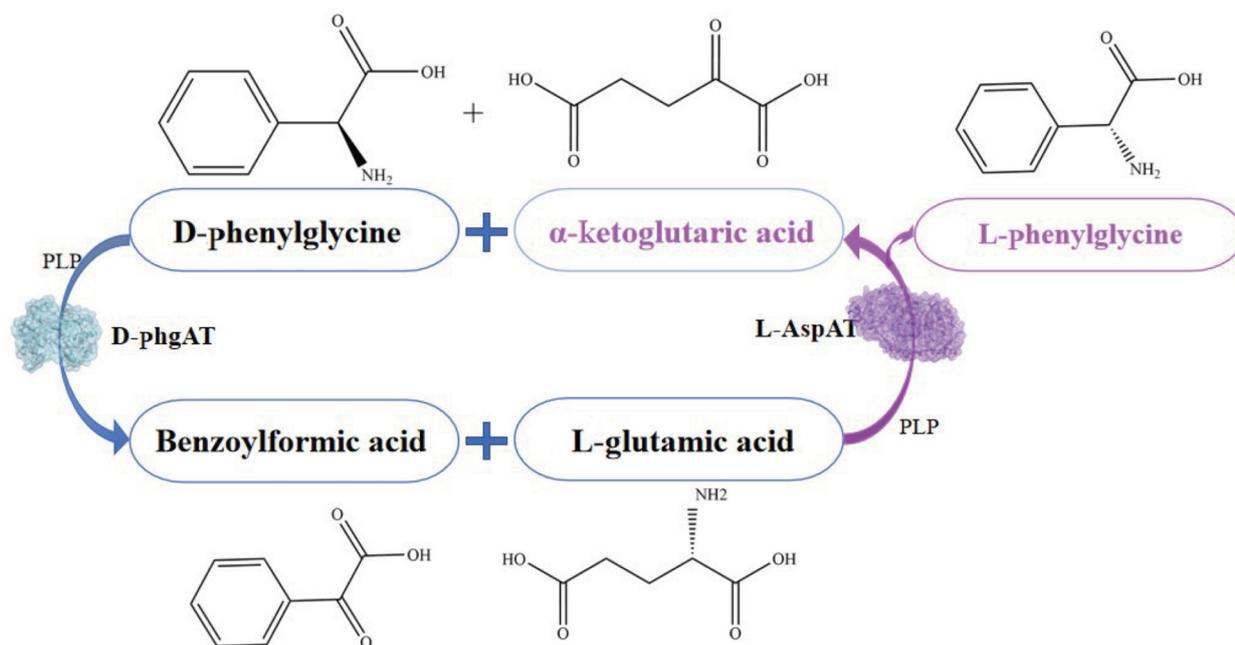


图8 亮氨酸拉链自组装融合酶级联反应

形成一个体外自组装融合酶, 通过以D-苯甘氨酸和 α 酮戊二酸为底物完成L-苯甘氨酸的产生, 实现D-苯甘氨酸向L-苯甘氨酸的手性转化^[52]。

从上述合成方法来看, L-苯甘氨酸的生产从化学合成逐步演化到生物酶法合成, 这些发展符合绿色生物合成的理念。生物酶法中利用酶的级联反应将廉价底物通过酶的催化反应获得L-苯甘氨酸, 这些也为之后针对非天然氨基酸生产的探究提供了理论基础。生物酶法的顺利完成也为后期对生物酶的探究和活性提高提供了思路。尤其是转氨酶的使用, 为L-苯甘氨酸s的生产提供了极大的便利^[53,54]: 转氨酶不依赖NADH, 解决了不对称合成中辅酶供应不足的问题。

4 展望

非天然氨基酸已是当前生物酶催化的研究热点, 但研究中还有许多问题需要解决, 尤其是合成路线的确定以及规模大小问题, 级联催化生产L-苯甘氨酸不仅在规模上可能受到限制, 对产品的纯化也亟需解决。生物酶法合成L-苯甘氨酸由于反应条件简单、能耗低、环境友好等优点逐渐成为主要研究趋势。因此, 未来对合成路线不断进行优化和改善将更有利于非天然氨基酸生产, 应该

将非天然氨基酸更多地应用于新型药物开发、生物医药、食品检测等领域, 为人类工业化的发展提供更加宝贵的应用价值。

参考文献

- [1] Shilova SA, Khrenova MG, Matyuta IO, et al. To the understanding of catalysis by D-amino acid transaminases: a case study of the enzyme from aminobacterium colombiense. *Molecules*, 2023, 28(5): 2109
- [2] 王选良. 天冬氨酸生产. 中国酿造, 1988(4): 1-5
- [3] Zhao J, Burke AJ, Green AP. Enzymes with noncanonical amino acids. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 55: 136-144
- [4] Li Y, Dalby PA. Engineering of enzymes using non-natural amino acids. *Biosci Rep*, 2022, 42(8): BSR20220168
- [5] Xue P, Yan XH, Wang Z. Lipase immobilized on HOOC-MCF: a highly enantioselective catalyst for transesterification resolution of (R,S)-1-phenylethanol. *Chin Chem Lett*, 2007, 18(8): 929-932
- [6] Salehi D, Mozaffari S, Zoghebi K, et al. Amphiphilic cell-penetrating peptides containing natural and unnatural amino acids as drug delivery agents. *Cells*, 2022, 11(7): 1156
- [7] Wang X, Yang X, Wang Q, et al. Unnatural amino acids: promising implications for the development of new antimicrobial peptides. *Crit Rev Microbiol*, 2023, 49(2): 231-255

- [8] Feng R, Wang M, Zhang W, et al. Unnatural amino acids for biological spectroscopy and microscopy. *Chem Rev*, 2024, 124(10): 6501-6542
- [9] Du J, Kong Y, Wen Y, et al. HUH endonuclease: a sequence-specific fusion protein tag for precise DNA-protein conjugation. *Bioorg Chem*, 2024, 144: 107118
- [10] Zhou Q, Chen M, Zhu L, et al. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, (11): 449-467
- [11] Denis JN, Correa A, Greene AE. Direct, highly efficient synthesis from (S)-(+)-phenylglycine of the taxol and taxotere side chains. *J Org Chem*, 1991, 56(24): 6939-6942
- [12] Moosmann D, Mokeev V, Kulik A, et al. Genetic engineering approaches for the fermentative production of phenylglycines. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(8): 3433-3444
- [13] Croteau R, Ketchum REB, Long RM, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev*, 2006, 5(1): 75-97
- [14] Gunosewoyo H, Kruger G. Antimycobacterial drug discovery: molecular therapeutics and target identification. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 997618
- [15] Ebeling SC. The synthesis of artificial sweeteners (phenylglycine-analogues of aspartame) in order to evaluate changes in the γ -glycophore component. *Food Chem*, 1998, 61(1-2): 107-112
- [16] Choroba OW, Williams DH, Spencer JB. Biosynthesis of the vancomycin group of antibiotics: involvement of an unusual dioxygenase in the pathway to S-4-hydroxyphenylglycine. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(22): 5389-5390
- [17] Mast YJ, Wohlleben W, Schinko E. Identification and functional characterization of phenylglycine biosynthetic genes involved in pristinamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*. *J Biotechnol*, 2011, 155(1): 63-67
- [18] Mattellone A, Corbisiero D, Cantelmi P, et al. Fast solution-phase and liquid-phase peptide syntheses (SolPSS and LPPS) mediated by biomimetic cyclic propylphosphonic anhydride (T3P[®]). *Molecules*, 2023, 28(20): 7183
- [19] Hennrich O, Weinmann L, Kulik A, et al. Biotransformation-coupled mutasynthesis for the generation of novel pristinamycin derivatives by engineering the phenylglycine residue. *RSC Chem Biol*, 2023, 4(12): 1050-1063
- [20] Prema. S PS, Rose. A L. Metal complexes of phenylglycine-o-carboxylic acid: preparation, characterization, electrochemical and biological properties. *Orient J Chem*, 2022, 38(3): 698-708
- [21] Lin S, Li Y, Li B, et al. Control of the handedness of self-assemblies of dipeptides by the chirality of phenylalanine and steric hindrance of phenylglycine. *Langmuir*, 2016, 32(29): 7420-7426
- [22] Zou H, Li L, Zhang T, et al. Biosynthesis and biotechnological application of non-canonical amino acids: complex and unclear. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(7): 1917-1927
- [23] Luo H, Liu Z, Xie F, et al. Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41(4): 491-512
- [24] Bhamboo P, Bera S, Mondal D. Synthesis of antiepileptic drug (R)-lacosamide and chronic pain reliever (S)-lacosamide from chiral glycine enolate equivalent. *J Org Chem*, 2023, 88(11): 6664-6670
- [25] Chubb FL, Edward JT, Wong SC. Simplex optimization of yields in the bucherer-bergs reaction. *J Org Chem*, 1980, 45(12): 2315-2320
- [26] 李记太, 李立军, 张能芳, 等. DL- α -苯甘氨酸合成方法的改进. *合成化学*, 1997(2): 107-109
- [27] 张林林, 孙家娟, 李敏, 等. 苯甘氨酸的合成研究. *山东化工*, 1998(2): 26-27
- [28] 郭秀斌, 刘庆彬, 薄海静, 等. N-乙酰苯甘氨酸的合成研究. *化学研究与应用*, 1998, 10(6): 661-662
- [29] 周淑晶, 张瑞仁, 王桂艳. 苯甘氨酸合成工艺的改进. *黑龙江医药科学*, 1999(6): 29
- [30] Tang CD, Zhang ZH, Shi HL, et al. Directed evolution of formate dehydrogenase and its application in the biosynthesis of L-phenylglycine from phenylglyoxylic acid. *Mol Catal*, 2021, 513: 111666
- [31] Gomm A, O'Reilly E. Transaminases for chiral amine synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 43: 106-112
- [32] Bezsudnova EY, Boyko KM, Nikolaeva AY, et al. Biochemical and structural insights into PLP fold type IV transaminase from *Thermobaculum terrenum*. *Biochimie*, 2019, 158: 130-138
- [33] Dutta Banik S, Bankura A, Chandra A. A QM/MM simulation study of transamination reaction at the active site of aspartate aminotransferase: free energy landscape and proton transfer pathways. *J Comput Chem*, 2020, 41(32): 2684-2694
- [34] Bezsudnova EY, Popov VO, Boyko KM. Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(6): 2343-2357
- [35] Gao X, Ma Q, Zhu H. Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of d-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(8): 3341-3349
- [36] Kobayashi J, Shimizu Y, Mutaguchi Y, et al. Characterization of d-amino acid aminotransferase from *Lactobacillus salivarius*. *J Mol Catal B Enzymatic*, 2013, 94: 15-

22

- [37] Yadav S, Jangra R, Sharma BR, et al. Current advancement in Biosensing techniques for determination of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase—a mini review. *Process Biochem*, 2022, 114: 71-76
- [38] Yoshimura T, Jhee KH, Soda K. Stereospecificity for the hydrogen transfer and molecular evolution of pyridoxal enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(2): 181-187
- [39] 张洪斌, 陈会永, 黄欢, 等. 一种 ω -转氨酶突变体及其应用: CN15896060A[P]. [20240428]. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=1u1b0gb0g-k670e9049610mj01t088521&site=xueshu_se
- [40] Jomrit J, Isarangkul D, Summpunn P, et al. A kinetic spectrophotometric method for the determination of pyridoxal-5'-phosphate based on coenzyme activation of apo-d-phenylglycine aminotransferase. *Enzyme Microb Tech*, 2018, 117: 64-71
- [41] Walton CJW, Thiebaut F, Brunzelle JS, et al. Structural determinants of the stereoinverting activity of *Pseudomonas stutzeri*-phenylglycine aminotransferase. *Biochemistry*, 2018, 57(37): 5437-5446
- [42] Osipenkov N, Kulik A, Mast Y. Characterization of the phenylglycine aminotransferase PglE from *Streptomyces pristinaespiralis*. *J Biotechnol*, 2018, 278: 34-38
- [43] Alonso FOM, Oestreicher EG, Antunes OAC. Production of enantiomerically pure D-phenylglycine using *Pseudomonas aeruginosa* 10145 as biocatalyst. *Braz J Chem Eng*, 2008, 25(1): 1-8
- [44] Gokhale DV, Bastawde KB, Patil SG, et al. Chemoenzymatic synthesis of d(-)phenylglycine using hydantoinase of *Pseudomonas desmolyticum* resting cells. *Enzyme Microb Tech*, 1996, 18(5): 353-357
- [45] Liu Q, Zhou J, Yang T, et al. Efficient biosynthesis of L-phenylglycine by an engineered *Escherichia coli* with a tunable multi-enzyme-coordinate expression system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(5): 2129-2141
- [46] Zhou Y, Wu S, Li Z. One-pot enantioselective synthesis of D-phenylglycines from racemic mandelic acids, styrenes, or biobasedl-phenylalanine *via* cascade biocatalysis. *Adv Synth Catal*, 2017, 359(24): 4305-4316
- [47] Al Toma RS, Bricke C, Cryle MJ, et al. Structural aspects of phenylglycines, their biosynthesis and occurrence in peptide natural products. *Nat Prod Rep*, 2015, 32(8): 1207-1235
- [48] Chiu HT, Hubbard BK, Shah AN, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8548-8553
- [49] Tang CD, Shi HL, Jia YY, et al. High level and enantioselective production of L-phenylglycine from racemic mandelic acid by engineered *Escherichia coli* using response surface methodology. *Enzyme Microb Tech*, 2020, 136: 109513
- [50] Cheng J, Xu G, Han R, et al. Efficient access to L-phenylglycine using a newly identified amino acid dehydrogenase from *Bacillus clausii*. *RSC Adv*, 2016, 6(84): 80557-80563
- [51] Liu J, Ding X, Wu Y, et al. Redesigning transamination and decarboxylation characteristics of L-aspartate aminotransferase by site directed mutation of non-active site. *Mol Catal*, 2024, 553: 113781
- [52] Liu J, Zhang X, Shao Z, et al. Leucine zipper as a bridge for transaminase self-assembly: a fusion enzyme for efficient chiral conversion of d-phenylglycine. *Bioorg Chem*, 2024: 107382
- [53] Wiyakrutta S, Meevootisom V. A stereo-inverting d-phenylglycine aminotransferase from *Pseudomonas stutzeri* ST-201: purification, characterization and application for d-phenylglycine synthesis. *J Biotechnol*, 1997, 55(3): 193-203
- [54] Voss M, Xiang C, Esque J, et al. Creation of (R)-amine transaminase activity within an α -amino acid transaminase scaffold. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(2): 416-424