



羟腈裂解酶在合成化学中应用的研究进展

郑宇璁, 郁惠蕾*, 许建和*

华东理工大学生物工程学院, 反应器工程国家重点实验室, 上海生物制造产业协同创新中心, 上海 200237

*通讯作者, E-mail: jianhexu@ecust.edu.cn; huileiyu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2022-11-04; 接受日期: 2023-01-30; 网络版发表日期: 2023-02-24

国家重点基础研究发展规划(编号: 2019YFA0905000)、国家自然科学基金(编号: 21922804)和中国科学院上海有机化学所开放课题资助项目

摘要 作为少数可以用于不对称催化C—C键合成/裂解的几类酶之一, 羟腈裂解酶因其可在相对温和的条件下实现氰醇或 β -硝基醇的高对映体选择性合成而受到了合成化学家的青睐. 有赖于分子生物学手段和蛋白质工程的快速发展, 近年来羟腈裂解酶在不对称合成中的应用得到进一步扩展. 本文就近年来耦合蛋白质工程改造后的羟腈裂解酶催化不对称羟腈化和硝基-羟醛缩合在生物活性分子的合成中的代表性应用进行总结, 并展望了未来羟腈裂解酶的发展方向.

关键词 羟腈裂解酶, 手性氰醇, 不对称催化, 非天然底物, 蛋白质工程

1 引言

解构目标化合物C—C键进行逆合成设计, 依然是目前最为有效的合成策略^[1]. 相较于已高度发展的化学合成方法, 酶促催化生成C—C键的反应通常在温和条件下进行, 并具备很高的化学选择性、区域选择性和立体选择性, 从而避免了合成过程中繁琐操作且对环境不友好的保护-脱保护过程, 在很大程度上降低了反应的能耗和副反应发生的可能. 因此, 近年来通过生物催化构建C—C键的策略为合成设计的绿色化和高效化带来了历史性机遇^[2-4]. 作为少数可用于不对称催化C—C键合成/裂解的生物酶之一, 羟腈裂解酶(hydroxynitrile lyase, HNL, E.C.: 4.1.2. X, X=10, 11, 46, 47)自发现就受到了有机化学家的持续关注, 并在底物的拓展方面做出了有益的尝试.

羟腈裂解酶广泛存在于生氰植物, 近年来来源已

扩展至细菌及少数节肢动物. 在生理条件下, 羟腈裂解酶参与腈类化合物的降解, 多为植物提供有效的化学防御机制. 对于合成化学家而言, 羟腈裂解酶的逆向反应(醛酮的不对称羟腈化或不对称Henry反应)可用于获取手性 α -氰醇或手性 β -硝基醇. 而手性氰醇或 β -硝基醇中的羟基、氰基/硝基可在保留手性的前提下经简单化学转化, 进而制备出一系列重要的药物合成元件. 例如, 通过简单的亲核取代, 氰醇的羟基可发生酯化、醚化, 或将氰醇转化为叠氮腈^[5]、氨基腈^[6]及氟代腈^[7]等. 同样, 氰基可通过 LiAlH_4 或硼烷进行还原转化为氨甲基^[8], 或通过DIBAL-H还原为醛基^[9]. 由于上述特性, 手性氰醇及 β -硝基醇已成为合成方法学中制备手性 α -羟基酸、 β -氨基醇、 α -羟基酮等合成单元的重要手性中间体, 具备广阔的合成应用潜力(图1). 值得注意的是, 虽然近20年来已经发展出一些催化 α -氰醇/氰醇酯生成的化学合成方法, 如利用手性连萘二酚

引用格式: Zheng YC, Yu HL, Xu JH. Recent progress in hydroxynitrile lyases: utilization in the synthetic chemistry. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 300–311, doi: 10.1360/SSC-2022-0217

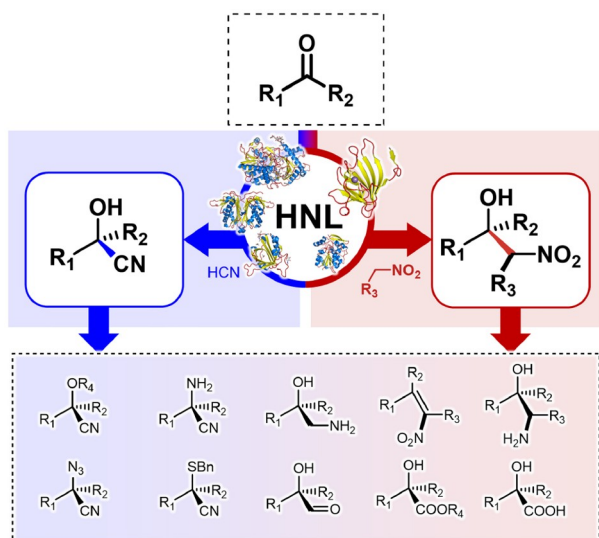


图1 羟腈裂解酶催化的不对称C-C键形成反应及其对应产物的化学转化(网络版彩图)

Figure 1 Asymmetric C-C bond formation reaction catalyzed by hydroxynitrile lyases and the chemical transformation of the corresponding products (color online).

衍生物、非天然二肽或钛/铪金属配体,在路易斯酸如钛酸异丙酯的催化下,实现了醛/酮与TMSCN的不对称硅氰化,但这些配体通常合成步骤冗长、反应条件较为严苛($-78\sim-20^{\circ}\text{C}$),并且立体选择性不够理想(一般情况下 $80\%\sim 90\%$ ee),在一定程度上限制了化学法在氰醇合成中的大规模应用^[10-15]。国际上著名精细化工或制药公司如Merck、BASF、DSM依然以羟腈裂解酶生物催化作为制备手性氰醇的主要手段^[16]。

如今,尽管羟腈裂解酶催化的醛和酮的不对称羟氰化已成为合成方法学的重要内容^[17]。但在水的存在下,醛酮化合物会与氰化氢自发发生无选择性的加成且反应速率高度依赖于反应体系的pH,从而造成了无选择性的化学自发反应与酶促反应的竞争,进一步影响了氰醇产物的光学纯度^[18]。由于羟氰化为碱催化过程,当且仅当反应体系水相 $\text{pH}<5$ 时,无选择性自发羟氰化反应才得以抑制^[18]。为此,酶促不对称羟氰化制备手性氰醇的策略依据其时间发展经历了以下三个阶段:(1) 20世纪60年代早期,不对称羟氰化通常在水相中采用低温、低pH进行反应,然而限于当时研究人员普遍认为酶催化反应只能在纯水相中进行,氰醇产物的光学纯度并不理想;(2) 20世纪80年代,Effenberger课题组^[19]提出在两相中采用低温、低pH进行反应,此时醛/酮与HCN的自发加成反应被极大程度地抑制,氰

醇产物的光学纯度显著提高,极大地拓展了其应用范围;(3) 20世纪90年代,Effenberger课题组^[20]将纯化的苦杏仁羟腈裂解酶吸附在微晶纤维素上,并置于被缓冲液饱和的有机溶剂中催化反应,使得自发反应被进一步抑制的同时也提高了固定化酶的传质效率;在国内则由林国强课题组^[21,22]率先采用脱脂植物种仁的策略,即利用疏水有机溶剂首先对含有羟腈裂解酶的组织进行脱脂脱水处理,此时羟腈裂解酶相当于固定在酶源生物组织残骸上,并可直接用于微水相反应。该方法进一步简化了酶制剂的制备步骤,在适当酶源下以苯甲醛为代表的系列芳香族醛的生物转化能达到很高的转化率和95%以上的ee值。然而,上述策略对羟腈裂解酶的耐酸和有机溶剂耐受性依然提出了较高要求,且天然羟腈裂解酶底物谱通常相对较窄,难以适应携带特定基团的底物,羟腈裂解酶在合成化学上的应用通常需联合蛋白质分子改造或反应工程以实现其价值。本文总结了近年来羟腈裂解酶在化学合成应用方面的进展,着重介绍了采用酶促不对称羟氰化及不对称Henry反应过程中所面临的关键科学问题,探讨了对应的解决方案,并结合本实验室的研究进展对当前存在的挑战和未来的研究前景进行了展望。

2 羟腈裂解酶的酶源开发

2.1 羟腈裂解酶的新酶鉴定

目前已被发现的生氰植物多达3000种,真正实现重组克隆的HNL却相对较少。这主要是由于羟腈裂解酶在自然界是趋同进化的产物,不同生物来源的羟腈裂解酶其结构和序列差异很大。在自然生理条件下表达的羟腈裂解酶往往只占其来源宿主总蛋白的很小部分,且通常由数个分子量接近却性能差别很大的羟腈裂解酶同工酶组成,因而存在活力低、无法与自发反应竞争导致产物光学纯度低下等问题。除最早广为人知的天然苦杏仁羟腈裂解酶(*PaHNLs*)和通过重组克隆表达的巴西橡胶树羟腈裂解酶(*HbHNL*)和木薯羟腈裂解酶(*MeHNL*)外,目前研究人员已成功鉴定并实现了数十种羟腈裂解酶的重组表达。表1总结了目前已实现重组表达的羟腈裂解酶的部分催化特性。

2.2 羟腈裂解酶的高通量筛选方法

为了高效地从自然资源中筛选生氰酶源或对已有

表 1 已实现异源表达的羟腈裂解酶举例^{a)}

Table 1 Examples of recombinant HNL and their properties^{a)}

立体选择性/酶	来源	表达宿主	耐受pH范围	催化Henry反应	天然底物	可接受底物	参考文献
(R)-PaHNL1	苦杏仁(<i>Prunus amygdalus</i>)	<i>P. pastoris</i>	4~11	否	苯甲醛/(R)-扁桃腈	取代苯甲醛	[23,24]
(R)-PaHNL5	苦杏仁(<i>Prunus amygdalus</i>)	<i>P. pastoris</i> / <i>A. niger</i>	2.5~11	否	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛/简单脂肪醛/甲基酮	[25~27]
(R)-PmHNL	日本梅(<i>Prunus mune</i>)	<i>P. pastoris</i>	3~9	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛/脂肪醛	[28]
(R)-LuHNL	亚麻(<i>Linum usitatissimum</i>)	<i>P. pastoris</i> / <i>E. coli</i>	>4	未知	丙酮/丙酮氰醇	脂肪醛	[29~32]
(R)-EjHNL	枇杷(<i>Eriobotrya japonica</i>)	<i>P. pastoris</i>	3~9	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	简单取代苯甲醛/脂肪醛	[33]
(R)-AtHNL	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>E. coli</i>	5~6.5	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛/脂肪醛/甲基酮	[34,35]
(R)-ChuaHNL	花莲章氏马陆(<i>Chamberlinius hualienensis</i>)	<i>P. pastoris</i>	2.5~9	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛	[36]
(R)-PlamHNL	火车马陆(<i>Parafontaria laminate</i>)	<i>E. coli</i>	>3.5	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛	[37]
(R)-GtHNL	苔原颗粒球菌(<i>Granulicella tundricola</i>)	<i>E. coli</i>	>4	是	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛	[38]
(R)-AcHNL	荚膜酸杆菌(<i>Acidobacterium capsulatum</i>)	<i>E. coli</i>	>4	是	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛	[38]
(R)-DrHNL1	兔脚蕨(<i>Davallia tyermannii</i>)	<i>P. pastoris</i> / <i>E. coli</i>	2.5~7	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛/脂肪醛	[39]
(R)-PeHNL	西番莲(<i>Passiflora edulis</i>)	<i>P. pastoris</i> / <i>E. coli</i>	未知	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛/脂肪醛	[40]
(R)-PcHNL5	巴达木(<i>Prunus communis</i>)	<i>P. pastoris</i>	2.5~6.5	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	芳香醛/脂肪醛	[41]
(R)-NdHNL	南天竹(<i>Nandina domestica</i>)	<i>E. coli</i>	3~6.5	未知	苯甲醛/(R)-扁桃腈	取代苯甲醛	[42]
(S)-HbHNL	橡胶树(<i>Hevea brasiliensis</i>)	<i>P. pastoris</i> / <i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i>	4~6.5	是	丙酮/丙酮氰醇	芳香醛/脂肪醛/甲基酮	[43]
(S)-MeHNL	木薯(<i>Manihot esculenta</i>)	<i>P. pastoris</i> / <i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i>	3.5~6.5	是	丙酮/丙酮氰醇	芳香醛/脂肪醛/甲基酮	[44]
(S)-SbHNL	高粱(<i>Sorghum bicolor</i>)	<i>P. pastoris</i>	3.5~6.5	未知	4-羟基苯甲醛/(R)-4-羟基扁桃腈	芳香醛	[45]
(S)-BmHNL	斑籽(<i>Baliospermum montanum</i>)	<i>E. coli</i>	4~6	是	丙酮/丙酮氰醇	芳香醛/脂肪醛/甲基酮	[46,47]

a) 加粗的为近10年内新鉴定的羟腈裂解酶

酶进行定向进化, 研究人员已逐渐由早期的高效液相色谱(HPLC)或气相色谱(GC)分析发展出羟腈裂解酶的高通量筛选方法. 其中最为经典的就是依据芳香族氰醇/醛的紫外差谱性质, 通过紫外-可见分光光度法进行高通量筛选(图2a). 由于苄位羰基与芳环系统共轭极大程度地增加了底物的紫外吸收, 而对应氰醇产物的紫外吸收峰则因为氰基和羟基的吸电子效应降低了苯环上的电子云密度从而使得化合物的紫外波谱整

体发生蓝移, 因而可以通过在苯甲醛的波峰段监测氰醇的裂解^[17,48]. 尽管该法灵敏度高, 且在实验室易于操作, 但底物结构的限制使得这一缺陷也很明显. 由于差谱法的灵敏度完全取决于羰基化合物与氰醇两者之间紫外特征吸收峰的差异, 因此一旦待检氰醇与羰基化合物的紫外特征吸收峰差距很小或目标反应底物/产物间没有共轭发色基团时, 该法就不再适用.

由于利用醛的特性测定HNL的裂解活力会受到底

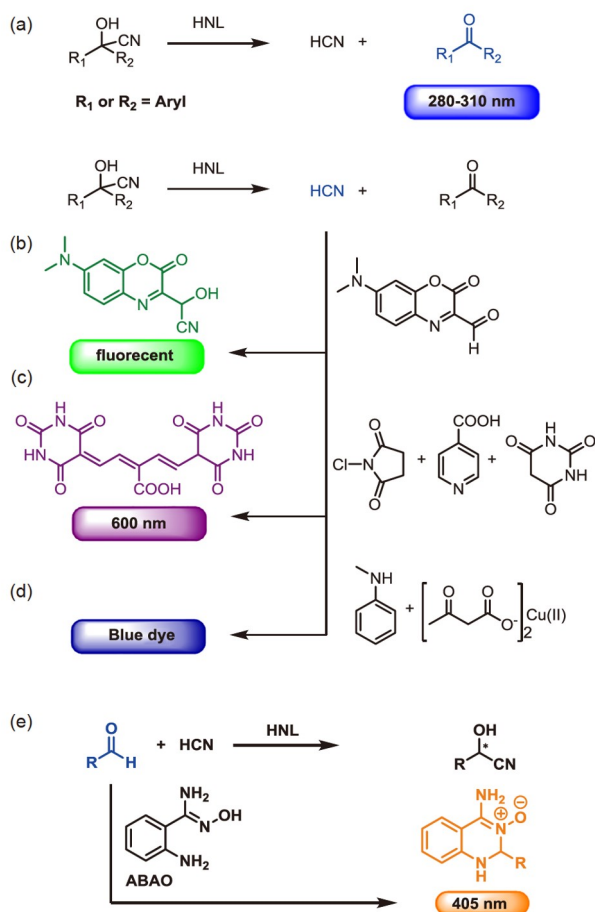


图 2 已开发的羟氰化高通量检测方法图示. 基于酶促氰醇裂解反应方向可分为: (a) 利用紫外差谱法测定芳香醛/酮; 或将反应产生的氰化氢与(b)荧光探针、(c) *N*-氯代琥珀酰亚胺、异烟酸和巴比妥酸反应, 或进行(d) Feigl-Anger测试反应产生发色物质. (e) 从酶簇氰醇合成反应方向, 则可利用2-氨基苄胺肟(2-aminobenzamidoxime, ABAO)与醛的关环发色反应测定酶促反应残留的醛(网络版彩图)

Figure 2 Schematic of available high throughput screening methods for activity assays of hydroxynitrile lyases. Based on the cyanohydrin cleavage, high throughput screening can be carried out either by (a) determination of the formed aromatic aldehydes/ketones, or quantification of the HCN by (b) fluorescence probe, (c) *N*-chlorosuccinimide/isonicotinic acid/barbituric acid based colorimetric reaction, (d) Feigl-Anger assay. (e) Based on the cyanohydrin synthesis reactions, 2-aminobenzamidoxime (ABAO) cycling assay can be used for quantification of residual aldehydes after enzymatic reactions (color online).

物结构的限制, 鉴于HCN是氰醇的通用裂解产物, HCN的高通量检测就成为高通量检测HNL的目标. Agarwalla课题组^[49]设计了荧光底物可偶联测定水相体系中的游离HCN, 但由于荧光底物本身就是醛类化合物并有可能成为HNL的一个潜在竞争性抑制剂, 同时该体系的检测限较高, 因此该法仅能在中性条件下

测定扁桃腈的裂解反应(图2b). Eggert课题组^[50]则利用*N*-氯代琥珀酰亚胺氧化HCN, 并与异烟酸和巴比妥酸反应产生紫色的发色物质, 从而允许在600 nm下快速监测反应的进程(图2c). 目前应用较多的是Krammer课题组^[51]基于Feigl-Anger实验(图2d)衍生出一种三明治夹层平板显色法, 用以检测以大肠杆菌为宿主重组HNL酶促氰醇裂解产生的HCN.

然而, 上述高通量筛选方法均依赖于监测氰醇裂解的去羟氰化反应, 并非真实需求的羟氰化反应. Glieder课题组^[52]曾报道利用2-氯扁桃腈筛选得到的氰醇裂解能力大幅度提升的突变体酶却在2-氯苯甲醛的羟氰化过程中收效甚微. 为建立更准确地测定羟氰化反应的高通量筛选方法, 本课题组^[53]利用商品化2-氨基苄胺肟与醛在酸性条件下自发关环产生荧光发色物质的原理, 成功构建了高通量测定羟氰化反应残留醛的方法. 该方法操作简单, 检测限可达 μM 水平(图2e). 由于酸性条件下, 亚胺阳离子的反应活性大幅度提升, 使得在显色剂2-氨基苄胺肟加入后, 即可瞬时完成醛进一步关环反应. 此外, 通过对28种结构各异的醛类化合物进行测试和粗酶反应测试表明, 发色反应与GC分析呈现出很好的数据一致性.

3 羟腈裂解酶的合成应用

3.1 氰醇的合成应用

3.1.1 取代苯甲醛的酶促羟氰化

取代的苯甲醛在羟氰化后生成对应的光学纯取代扁桃腈, 可广泛应用于医药领域的手性合成子构建. 其中最具代表性的是(*R*)-2-氯-扁桃腈(**2**), 该氰醇经简单酸水解后产生的(*R*)-2-氯-扁桃酸(**3**)是重磅抗凝血药物氯吡格雷(Clopidogrel, **4**)的关键中间体^[18] (图3). 然而, 由于2-氯取代在苯环上引入了空间位阻并由于吸电子效应提升了醛基的自发羟氰化反应活性, 采用脱脂杏仁粉催化该反应的氰醇产物光学纯度一直不够理想^[27]. 尽管Glieder课题组经过理性设计和随机突变改造了苦杏仁羟腈裂解酶*PaHNL5*, 并获得一系列突变体(A111G^[25]或L1Q/N3I/I108M/A111G/4E10^[52]), 使得突变体酶可在2 h内实现3 M 2-氯苯甲醛(**1**)的基本转化(最高转化率94.6%, *ee*=98.6%). Steiner课题组^[54]将荚膜杆菌来源的(*R*)-*GtHNL*在大肠杆菌进行重组表达, 并通过随机突变和组合突变的方法筛选了10000个突

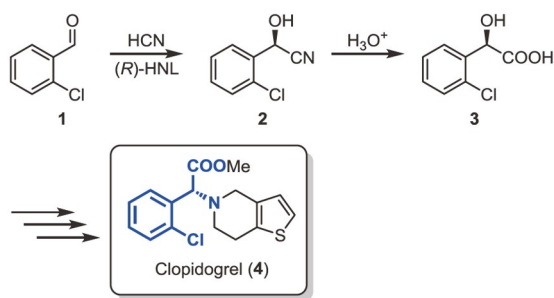


图3 (*R*)-2-氯-扁桃腈及其在氯吡格雷的合成应用(网络版彩图)

Figure 3 Synthesis of (*R*)-2-Cl-mandelonitrile, the key chiral intermediate for Clopidogrel (color online).

变株, 最终获得了一个三点突变A40H/V42T/Q110H, 使得对0.5 M上载量的**1**第一次实现了彻底羟氰化(转化率>99%, *ee*>99.4%). Asano课题组^[37]则通过理性设计得到了火车马陆(*Parafontaria laminate*)羟腈裂解酶(*R*)-*PlamHNL*单点突变体N85Y, 在水相中催化转化50 mM醛**1**的羟氰化反应取得了较优的反应效果, 转化率达到91%, *ee*=96%.

除了苯环2-取代位置外, 对位取代的苯甲醛同样具备重要的合成价值. 作为国内酶促羟氰化的开拓者, 林国强课题组^[55]通过对一系列生氰植物进行筛选, 发现产自我国新疆的巴达木(*Prunus communis*)是一种优秀的羟腈裂解酶酶源, 其脱脂巴达木种仁粉对于许多大位阻尤其是3-取代、4-取代苯甲醛均表现出较高的催化活性和立体选择性. 其中, 通过脱脂巴达木粉在微水相中反应, 可将4-甲硫基-苯甲醛(**5**)实现羟氰化, 反应12 h, 产率为86%、*ee*=96%. 以对应氰醇(**6**)出发, 最终以9步线性总收率26%和10步18%线性总收率实现了广谱兽用抗生素甲砒霉素(Thiampenicol, **7**)和氟苯尼考(Flurfenicol, **8**)的化学-酶法全合成(图4). 野生巴达木羟腈裂解酶的其中一个同工酶被成功纯化并测定了其N端碎片序列, 但由于其完整序列信息未知, 重组表达并未实现^[56]. 为了进一步拓展巴达木羟腈裂解酶(*PcHNL*)的合成应用, 本课题组^[41]通过保守区域设计简并引物的方法克隆了巴达木的4个羟腈裂解酶同工酶(*PcHNL1*, *PcHNL2*, *PcHNL4*, *PcHNL5*). 其中, *PcHNL5*对一系列取代苯甲醛均具备极佳的反应效果. 在优化的柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)/甲基叔丁基醚两相体系中, *PcHNL5*可实现400 mM的醛**5**的彻底羟氰化, 反应4 h, 产率为94%, *ee*>99%. 在此基础上, 通过对

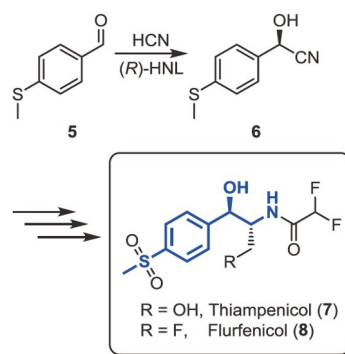


图4 (*R*)-4-甲硫基-扁桃腈及其在甲砒霉素/氟苯尼考的合成应用(网络版彩图)

Figure 4 Synthesis of (*R*)-2-hydroxy-2-(4-(methylthio)phenyl)acetonitrile, the key chiral intermediate for thiampenicol and flurfenicol (color online).

*PcHNL5*进行定点饱和突变得到单点突变体L343F, 其pH 2.5的半衰期长达110 h, 并能在12 h完成1 M醛**5**的羟氰化, 其转化率为97%, *ee*>99%^[55].

3.1.2 杂环芳香醛的酶促羟氰化

含杂环的光学纯氰醇同样被大规模应用于构建药物或天然产物合成. 较苯甲醛而言, 大多数杂环芳香醛的自发反应活性随杂原子吸电子效应的增强而提高. 因而, 杂环芳香醛的酶促不对称羟氰化对羟腈裂解酶的反应活性提出了更高的要求.

手性四氢异喹啉广泛存在于天然产物并可作为药物砌块. Rominger课题组^[57]在微水相条件下利用苦杏仁羟腈裂解酶*PaHNL*将取代呋喃2-甲醛羟氰化并偶联金催化剂, 最终实现了四氢异喹啉的制备(图5). DSM公司开发的CF₃COOH-BH₃可快速还原2-呋喃醛对应的(*R*)-氰醇(**10**), 通过橡胶树羟腈裂解酶*HbHNL*羟氰化后随即进行在位硼烷还原, 对应的光学纯β-氨基醇**12**可轻易完成千克级别的制备^[58].

韩世清课题组^[59]利用脱脂枇杷粉在微水相中完成了7-乙基-苯并呋喃2-甲醛(**14**)的羟氰化, 并以此出发构建了β-受体阻断剂(*S*)-丁呋洛尔((*S*)-Bufuralol, **16**, 图6)的化学-酶法合成路线(4步, 线性总收率23.3%). 但由于呋喃2-甲醛通常较苯甲醛具备更高的自发反应活性, 且加上7-乙基和苯并环的介入, 大幅度降低了羟腈裂解酶的反应活性, 即使在微水相中, 反应获得的氰醇*ee*仅达70%. 本课题组^[60]通过理性设计创制的*PcHNL5*突变体工具箱, 获得单点突变L331V, 实现了200 mM

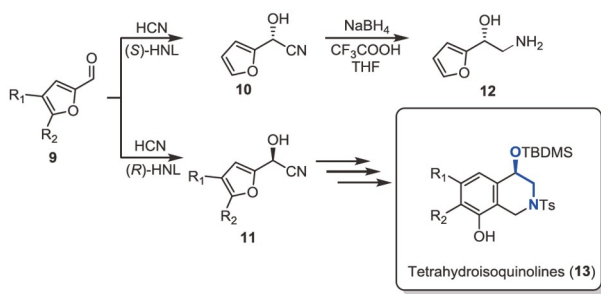


图 5 取代呋喃醛的羟氰化及其在四氢异喹啉衍生物的合成中的应用(网络版彩图)

Figure 5 Asymmetric hydrocyanation of the substituted furfurals to access the key intermediate for tetrahydroisoquinolines (color online).

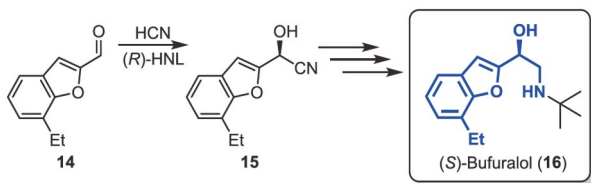


图 6 7-乙基-苯并呋喃-2-甲醛的羟氰化及在(S)-丁呋洛尔的合成应用(网络版彩图)

Figure 6 Asymmetric hydrocyanation of 7-ethylbenzofuran-2-carbaldehyde to access the key chiral intermediate for (S)-bupuralol (color online).

7-乙基-苯并呋喃-2-甲醛的羟氰化, 反应12 h, 转化率为94%, $ee=95\%$.

3.1.3 大位阻芳香醛的羟氰化

为了应对化学合成需求的日益多样化, 功能性基团或合成需求的保护/脱保护基团的引入常造成化学反应路线和酶反应活性低下的问题. 在针对复杂非天然底物转化所设计的化学酶法合成新路线中, 构建高效的酶促反应, 往往成为最具挑战性的技术瓶颈. 目前, 基于酶三维结构信息进行的理性设计, 仅需要在酶活性口袋进行少量的点突变, 就可能获得底物特异性显著变化的目标酶, 成为目前改造羟氰裂解酶以提高其对大基团底物的活性和选择性的有效方法.

(S)-3-苯氧基-扁桃腈是合成手性农药氰氯菊酯(Cypermethrine, 19)的合成中间体(图7)^[61]. 然而, 目前已知的所有(S)-HNL野生型对3-苯氧基苯甲醛活力均远低于其天然底物苯甲醛. Effenberger课题组通过理性设计木薯羟腈裂解酶MeHNL得到了单点突变体W128A^[62], 对3-苯氧基的时空产率可达 $57\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$, $ee=95\%$ ^[63]. 基于图2d的高通量筛选方法, Schwab课题

组^[51]筛选了包括50万个HbHNL的随机突变体的文库, 并获得了催化3-苯氧基-苯甲醛的有益突变D111L/W128A/S132A.

苯二氮平类药物(Benzodiazepine, 22)是一类中枢神经抑制剂, 目前常作为临床镇静催眠剂, 亦用于癫痫、焦虑等症的治疗. 然而, 由于该底物的醛基并未参与苯环共轭体系, 其无选择性地自发反应较强, 且苯并[d][1,3]二氧五环的引入大幅度提升了底物的空间位阻, 大幅降低了酶对于该底物的活性. 为实现该底物的顺利羟氰化, 本课题组^[60]利用理性设计的PcHNL5小巧突变体工具箱, 获得单点突变L331G, 实现了500 mM底物醛20在反应12 h后的基本转化, 其反应转化率95%, ee 由野生型的33%提升至95% (图8).

β_2 -肾上腺素受体激动剂是一类广泛应用于治疗哮喘及慢性阻塞性肺疾病的药物. 理论上, 经2-取代-苯并[d][1,3]二噁烷-6-甲醛(23)羟氰化获得的氰醇经腈基还原, 即可获得典型 β_2 -肾上腺素受体激动剂(26~28)的通用前体氨基醇25. 尽管Effenberger课题组^[64]利用羟基纤维素固定化的苦杏仁羟腈裂解酶PaHNL在微水相中实现了四氢-苯并[d][1,3]二噁烷-6-甲醛和2-甲基-四氢-苯并[d][1,3]二噁烷-6-甲醛的不对称羟氰化, 但是由于双羟基保护基团如甲醛及乙醛保护不易脱

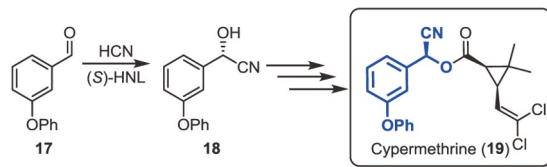


图 7 (S)-3-苯氧基-扁桃腈及其在氰氯菊酯的合成应用(网络版彩图)

Figure 7 Synthesis of (S)-3-phenoxybenzyl cyanohydrin, the key chiral precursor of cypermethrine (color online).

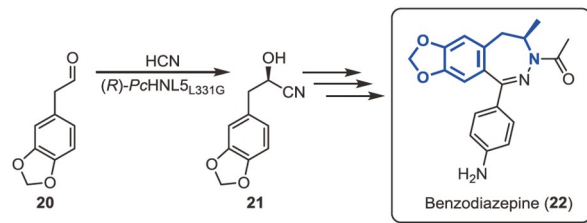


图 8 2-(苯并[d][1,3]二氧五环)乙醛的羟氰化及在苯二氮平的合成应用(网络版彩图)

Figure 8 Asymmetric hydrocyanation of 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)acetaldehyde to access the key chiral precursor of benzodiazepine (color online).

除, 在后续合成转化脱保护时需要在盐酸中的回流反应脱除缩醛保护基, 而苄位上的羟基则因形成碳正离子而造成手性中心的彻底消旋化. Hunter课题组^[65]通过条件控制和反应中间体筛选发现, 通过增大苯并二噁烷环C2位上的位阻: 仅当双羟基用丙酮(异丙叉)保护后, 该保护基才能在弱酸水溶液中轻易脱除, 此时不足以产生碳正离子, 苄位羟基的外消旋化可以得到有效抑制. 但可能是因为酶源问题, 并无任何有关羟腈裂解酶催化上述2,2-二甲基-苯并[d][1,3]二噁烷-6-甲醛的报道. 为攻克上述难题, 本课题组^[60]通过基于PcHNL5与天然底物苯甲醛的复合物晶体结构进行理性设计构建的小巧突变体文库成功获得一单点突变体L331A, 针对2,2-二甲基-四氢-苯并[d][1,3]二噁烷-6-甲醛的羟腈化催化常数($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$)达到了野生型的2526倍. 在200 mM底物上载时, L331A突变体反应16 h即可完成反应(转化率96%, $ee>99\%$), 显著高于野生型(转化率 $<1\%$, $ee=55\%$). 以对应光学纯氰醇出发, 经氢化铝锂还原制得 β -氨基醇, 以3步54%线性总收率实现了光学纯(R)-沙美特罗((R)-Salmeterol, **26**)的化学酶法克级合成(图9).

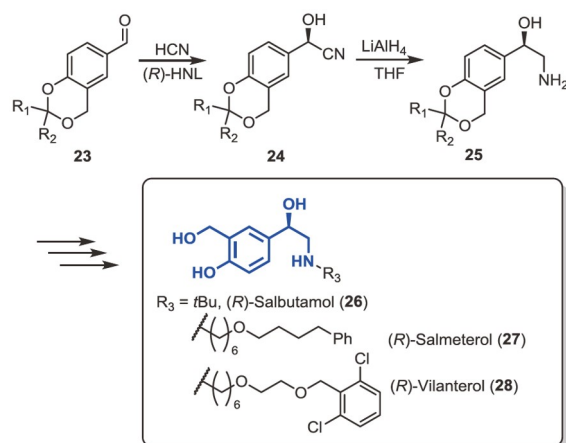


图9 2-取代苯并[d][1,3]二噁烷甲醛的羟腈化及在典型 β_2 -受体激动剂的合成应用(网络版彩图)

Figure 9 Asymmetric hydrocyanation of 2-ethylbenzofuran-2-carbaldehyde for the synthesis the classic β_2 -adrenergic receptor agonists (color online).

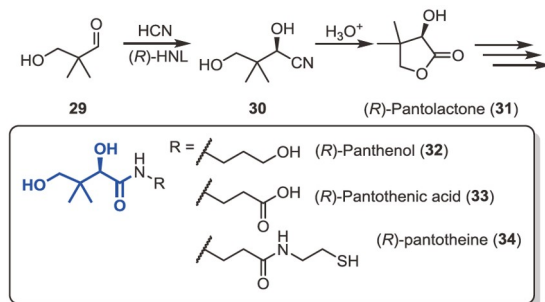


图10 3-羟基特戊醛的羟腈化及在维生素B5衍生物关键前体(R)-泛内酯的合成应用(网络版彩图)

Figure 10 Asymmetric hydrocyanation of hydroxypivalaldehyde to access the (R)-pantolactone, the key precursor of vitamin B5 derivatives (color online).

3.1.4 脂肪醛的羟腈化

脂肪氰醇可广泛用于构建精细化工原料或天然产物砌块. 尽管大多数HNL的天然底物为苯甲醛/扁桃腈, 但目前也已鉴定出不少可催化脂肪醛底物的(R)-HNL (如PmHNL、PaHNL、PcHNL); (S)-HNL(如HbHNL和MeHNL), 对脂肪醛具备一定催化效果.

羟基特戊醛(**29**)经羟腈化后生成对应的(R)-氰醇(**30**), 经酸水解自发脱水内酯化即可制得合成维生素B5 (**33**)及其功能衍生物(**32**, **34**)的重要前体(R)-泛内酯(**31**, 图10)^[66]. 该合成路线的主要挑战是羟基特戊醛本身除自发无选择性羟腈化反应外, 在有机溶剂或在水相pH>3时会发生自发二聚形成缩醛^[67].

Glieder课题组^[68]通过对苦杏仁羟腈裂解酶PaHNL5进行活性口袋的定点饱和突变, 从而筛选到一个单点突变体V317A. 该突变体较野生型大幅度提升了酶对醛**29**的羟腈化反应活力. 在pH 2.5的柠檬酸缓冲液体系中, 醛**29**倾向于向单体形式存在, 此时羟腈化自发反应也近乎停止, 以PaHNL5_{V317A}作为催化剂, 在200 mM底物上载量条件下, 反应可在6 h完成完全转化(转化率=100%), 其氰醇产物 $ee=97\%$. 此外, Wink-

ler课题组^[69]尝试将兔角蕨羟腈裂解酶DtHNL1固定化为交联酶聚集体(cross-linked enzyme aggregate, CLEA), 用以尝试羟基特戊醛的羟腈化, 然而其 ee 仅20%.

(R)-2-羟基-4-苯基丁腈(**36**)经简单酸水解即可制得(R)-2-羟基-4-苯基丁酸(**37**), **37**是作为血管紧张肽转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂的关键合成子, 广泛用于合成“普利”(prils, **38~41**)类药物(图11)^[70]. Glieder课题组^[71]通过理性设计PaHNL5获得单点突变V360I, 可实现苯丙醛(**35**) 3 M上载量的羟腈化反应, 转化率98%, $ee=95.3\%$. 而通过定向进化获得的突变体GtHNL_{A40H/V42T/Q110H}, 可转化0.5 M的醛**35**, 其转化率94.7%, $ee=98.5\%$ ^[54]. 本课题组^[60]通过理性设计构建的PcHNL5突变体工具箱中筛选到单点突变

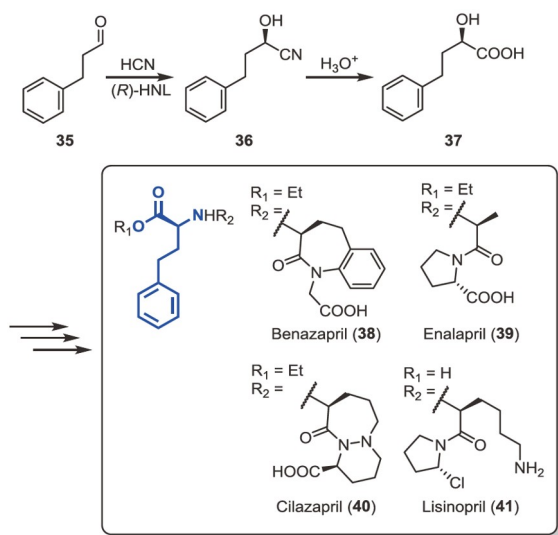


图 11 苯丙醛的羟氰化及在ACE抑制剂“普利”类药物关键前体(R)-2-羟基-4-苯基丁腈的合成应用(网络版彩图)

Figure 11 Asymmetric hydrocyanation of hydrocinnamaldehyde to access the (R)-2-hydroxy-4-phenyl-3-butenitrile, the key precursor of “prils”, the ACE inhibitors (color online).

L331V, 在醛35上载量为1 M时, 反应12 h转化率为95%, $ee=99\%$.

3.2 β -硝基醇的合成应用

除了酶促不对称羟氰化外, 部分羟腈裂解酶可利用硝基烷烃作为亲核试剂催化不对称Henry反应. Griengl课题组^[72]利用HbHNL催化苯甲醛(42)与硝基乙烷的Henry反应, 反应得到的 $anti$ -硝基醇43与 syn -41比例达到9:1, 且产物 $anti$ -43相较于 syn -43的对映体过量值(ee)超过95%, 由于配体催化的不对称Henry反应在控制C2位手性中心的立体选择性一直是Henry反应的难点, HbHNL成为第一例可直接较好控制双手性中心的不对称Henry反应案例. 由(1*S*,2*R*)-43出发, 经Pd/C催化氢化硝基和胺甲基化, 即可直接获得(+)-麻黄碱((+)-ephedrine, 44, 图12).

后续发现细菌来源的GtHNL和AcHNL均可催化硝基乙烷与苯甲醛的不对称Henry反应, 由于GtHNL和AcHNL的立体选择性与HbHNL相反, 由二者催化苯甲醛(42)与硝基乙烷的Henry反应即可制得相反构型的硝基醇43, 且利用GtHNL和AcHNL的突变体A40H可显著提升其催化效率. 在反应过程24 h后, $anti$ -硝基醇43与 syn -41比例达到2:1, 对应C1的 ee 值=85%^[73].

醛与硝基甲烷经羟腈裂解酶催化Henry加成产生

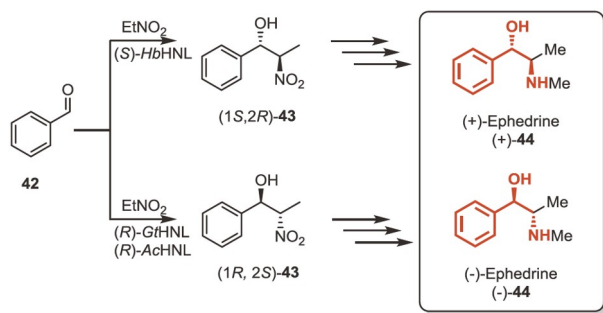


图 12 苯甲醛与硝基乙烷的不对称Henry加成及其在麻黄碱的合成(网络版彩图)

Figure 12 Asymmetric nitroaldol addition of benzaldehyde and the synthesis of ephedrine (color online).

的 β -硝基醇可在同样经化学氢化还原制备得到 β -氨基醇. 目前, 除醛与硝基烷烃的Henry加成反应外, Padhi课题组^[74]采用动力学拆分的方案在两相反应体系中利用羟腈裂解酶催化 β -硝基醇的去硝醇裂解反应制备相反构型的 β -硝基醇, 由于羟腈裂解酶催化去硝醇裂解反应的活力远大于Henry加成反应, 反应可在相对较短的时间内完成, 从而避免了以往合成过程中由于反应时间过长而积累无选择性自发硝醇裂解/合成的消旋化反应. 其反应适应性可进一步拓展至其他位阻型底物, 如合成肾上腺素激动剂甲氧胺(Methoxamine, 47)、北美龟草素(Chelonin A, 48)等多甲氧基取代苯甲醛(图13). 进一步通过定向进化筛选到的AtHNL突变体F179N, 其催化裂解(R)-2-硝基-1-苯乙醇对比(S)-扁桃腈的催化偏好性(k_{cat}/K_m)达到了野生型的13倍^[75].

4 羟腈裂解酶参与的级联反应

为了适应绿色合成的需求, 更多的化学家开始尝试利用多酶级联或酶/化学级联的方案构建在位多步骤的转化. 由于氰醇不稳定, 通常需将羟基保护合成氰醇酯. Schallmeyer课题组^[76]同时串联MeHNL对4-甲氧基苯甲醛(49)的羟氰化反应和南极假丝酵母脂肪酶CALA催化的酯交换反应, 在一锅法微水相体系中实现了对应(S)-O-苯甲酸酯(51)的级联合成(图14), 49的整体转化率达到83%, $ee=98\%$. Ley课题组^[77]则设计了流化床级联方案, 通过南极假丝酵母脂肪酶CLAB水解氰基甲酸乙酯(52)在位生成HCN, 继而与芳香醛53混合经固定化的AtHNL合成(R)-氰醇54, 随后与另一管路提供的乙酸酐、吡啶在位衍生化保护羟基, 最终

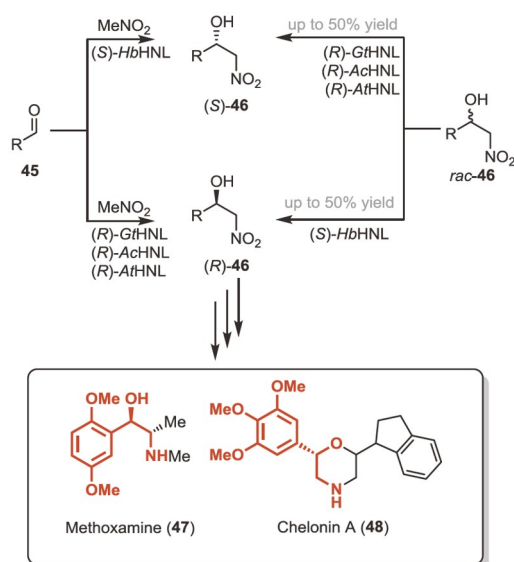


图 13 醛与硝基乙烷的不对称Henry加成或动力学拆分去硝醇反应制备手性β-硝基醇(网络版彩图)

Figure 13 Asymmetric nitroaldol addition of benzaldehyde and the synthesis of ephedrine (color online).

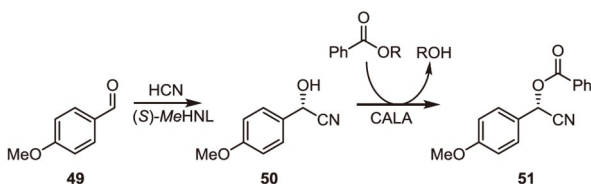


图 14 一锅双酶级联合成(S)-O-苯甲酰-4-甲氧基扁桃腈

Figure 14 One-pot biocatalytic synthesis of (S)-4-methoxymandelonitrile benzoate.

得到O-乙酰化保护的氰醇 55 (图15), 其最高线性总转化率 $>99\%$, $ee>99\%$.

尽管光学纯扁桃腈可在保持对应手性中心不消旋的情况下经酸水解获得对应立体构型的扁桃酸 $^{[78]}$, 但该反应依然需要浓盐酸的引入. 为进一步构建扁桃酸的绿色合成途径, Stolz课题组 $^{[79]}$ 利用共表达MeHNL和来源于荧光假单胞菌(*P. fluorescens* EBC 191)的腈水解酶的大肠杆菌整细胞在柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)/异丙醚两相体系中, 成功实现了(S)-扁桃酸从100 mM上载苯甲醛的双酶级联合成, 转化率96.4%, $ee>99\%$. 遗憾的是, 由于荧光假单胞菌腈水解酶存在腈的不彻底水解问题, 其最终水解产物中有41.7%为(S)-扁桃酰胺. 类似地, Stolz课题组 $^{[80]}$ 与Sheldon课题组 $^{[81]}$ 都分别将MeHNL和腈水解酶固定化为CLEA, 以脂肪醛和KCN为底物, 实现了一系列脂肪酰胺的合成, 其

$ee>95\%$ (图16).

近年来, 光催化反应的迅猛发展使得光催化偶联其他反应催化制备功能化合物成为绿色合成化学发展的热门话题. 利用光催化剂可在紫外激发下产生自由基, 进而实现烃类的C-H键活化(O功能化). Schmidt课题组 $^{[82]}$ 利用蒽醌磺酸钠(sodium anthraquinone sulfonate, SAS)在422 nm紫外线激发下催化氧化苯取代甲苯(59)获得对应取代芳香醛(53), 进一步添加PaHNL或固定化的MeHNL, 顺利实现了一系列芳香烷烃的C-H双功能化(图17). 其反应最高转化率 $>99\%$, $ee>99\%$, 并能实现氰醇的克级制备.

5 总结与展望

羟腈裂解酶发现至今已历百年, 伴随蛋白质工程和反应工程的发展, 生物催化制备手性氰醇和手性β-

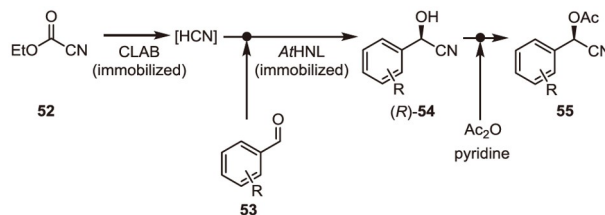


图 15 酶/化学合成(R)-O-乙酰-氰醇

Figure 15 Chemo-enzymatic cascade synthesis of O-acetylated cyanohydrins.

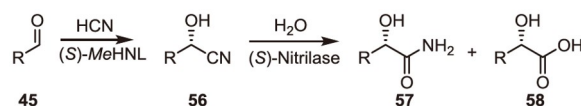


图 16 双酶级联合成α-羟基酸/α-羟基酰胺

Figure 16 One-pot biocatalytic synthesis of α-hydroxy acids/α-hydroxy amides.

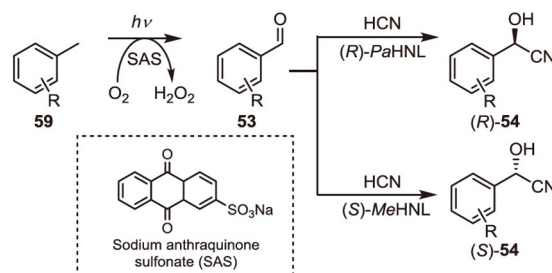


图 17 光-化学/酶催化C-H活化合成手性氰醇

Figure 17 Photo-chemo-enzymatic approach for C-H bond transformation to prepare chiral cyanohydrins.

硝基醇目前已逐步成熟. 对于创制新型高值复杂生物活性化合物的化学-酶法合成路线, 缩短合成步骤和大幅提升合成效率需要逆合成分析与蛋白质工程、基因工程和化学工程的有机结合.

目前, 大量研究已经聚焦于羟腈裂解酶对于醛类底物的转化利用. 对于酮类底物的应用则报道较少(仅见甲基酮的转化). 然而, 对于含有叔醇手性中心的复杂功能性化合物的合成而言, 酮氰醇同样极具合成价值^[79]. 由于目前已有不少羟腈裂解酶-醛/氰醇复合物晶体结构的报道, 基于结构-功能关系的酶口袋结构微调则有望于成为打开生物催化酮不对称羟氰化/Henry

反应大门的钥匙. 鉴于当前基于深度学习的蛋白质从头设计(如Rosetta)技术已日渐成熟, 未来可能可以通过从头设计实现羟腈裂解酶对其他氰基供体如TMSCN的利用; 或实现其他不饱和键与亲核试剂的不对称加成反应(如Strecker反应). 此外, 通过逆转录文库和高通量筛选等手段将有助于进一步鉴定更多的羟腈裂解酶, 拓展现有羟腈裂解酶工具箱, 耦合光催化自由基产生的原理于黄素依赖型羟腈裂解酶(如PcHNL5、PaHNL5等)则可能激发羟腈裂解酶的催化紊乱性、通过定向进化技术进一步拓展和强化羟腈裂解酶的催化性能和合成适用范围.

致谢 感谢中国科学院上海有机化学所洪然研究员和华东理工大学张元兴教授对论文写作的指正及宝贵建议.

参考文献

- Corey EJ, Kurti L. *Enantioselective Chemical Synthesis: Methods, Logic, and Practice*. Heidelberg: Elsevier, 2013
- Lin G, Chen Y, Li Y. *Chiral Synthesis: Asymmetric Reactions and Their Applications*. Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese) [林国强, 陈耀全, 李月明. 手性合成: 不对称反应及其应用. 北京: 科学出版社, 2007]
- Xu J, Yu H. *Biocatalyst Engineering: Principle and Application*. Beijing: Chemical Industry Press Co., Ltd., 2016 (in Chinese) [许建和, 郁惠蕾. 生物催化剂工程: 原理及应用. 北京: 化学工业出版社, 2016]
- Hönig M, Sondermann P, Turner NJ, Carreira EM. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 8942–8973
- Effenberger F, Kremser A, Stelzer U. *Tetrahedron-Asymmetry*, 1996, 7: 607–618
- Gaucher A, Ollivier J, Salaün J. *Synlett*, 1991, 1991: 151–153
- Stelzer U, Effenberger F. *Tetrahedron-Asymmetry*, 1993, 4: 161–164
- Ziegler T, Hörsch B, Effenberger F. *Synthesis*, 1990, 1990: 575–578
- North M. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2003, 14: 147–176
- Baleizão C, Gigante B, Garcia H, Corma A. *J Catal*, 2003, 215: 199–207
- Brunel JM, Holmes IP. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 2752–2778
- Casas J, Baeza A, Sansano JM, Nájera C, Saá JM. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2003, 14: 197–200
- Choi MCK, Chan SS, Matsumoto K. *Tetrahedron Lett*, 1997, 38: 6669–6672
- Hamashima Y, Kanai M, Shibasaki M. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42: 691–694
- Tian J, Yamagiwa N, Matsunaga S, Shibasaki M. *Angew Chem*, 2002, 114: 3788–3790
- Bracco P, Busch H, von Langermann J, Hanefeld U. *Org Biomol Chem*, 2016, 14: 6375–6389
- Clayden J, Greeves N, Warren S. *Organic Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 2012
- Andexer JN, Langermann JV, Kragl U, Pohl M. *Trends Biotechnol*, 2009, 27: 599–607
- Effenberger F, Ziegler T, Förster S. *Angew Chem Int Ed*, 1987, 26: 458–460
- Effenberger F. *Angew Chem Int Ed*, 1994, 33: 1555–1564
- Chen P, Han S, Lin G, Li Z. *J Org Chem*, 2002, 67: 8251–8253
- Han S, Chen P, Lin G, Huang H, Li Z. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2001, 12: 843–846
- Jorns MS. *J Biol Chem*, 1979, 254: 12145–12152
- Jorns MS. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 613: 203–209
- Glieder A, Weis R, Skranc W, Poechlauer P, Dreveny I, Majer S, Wubbolts M, Schwab H, Gruber K. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 4815–4818
- Pavkov-Keller T, Bakhuis J, Steinkellner G, Jolink F, Keijmel E, Birner-Gruenberger R, Gruber K. *J Biotechnol*, 2016, 235: 24–31

- 27 Weis R, Poechlauer P, Bona R, Skranc W, Luiten R, Wubbolts M, Schwab H, Glieder A. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 2004, 29: 211–218
- 28 Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Lückl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H. *Protein Exp Purif*, 1997, 11: 61–71
- 29 Albrecht J, Jansen I, Kula MR. *Biotechnol Appl Biochem*, 1993, 17: 191–203
- 30 Breithaupt H, Pohl M, Bönigk W, Heim P, Schimz KL, Kula MR. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 1999, 6: 315–332
- 31 Trummel K, Wajant H. *J Biol Chem*, 1997, 272: 4770–4774
- 32 Xu LL, Singh BK, Conn EE. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 263: 256–263
- 33 Fukuta Y, Nanda S, Kato Y, Yurimoto H, Sskai, Komeda H, Asano Y. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1231–1238
- 34 Andexer J, von Langermann J, Mell A, Bocola M, Kragl U, Eggert T, Pohl M. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 8679–8681
- 35 Asano Y, Tamura K, Doi N, Ueatrongchit T, H-kittikun A, Ohmiya T. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69: 2349–2357
- 36 Dadashpour M, Ishida Y, Yamamoto K, Asano Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10605–10610
- 37 Nuyler A, Nakabayashi M, Yamaguchi T, Asano Y. *ACS Omega*, 2020, 5: 27896–27908
- 38 Hajnal I, Łyskowski A, Hanefeld U, Gruber K, Schwab H, Steiner K. *FEBS J*, 2013, 280: 5815–5828
- 39 Lanfranchi E, Pavkov-Keller T, Koehler EM, Diepold M, Steiner K, Darnhofer B, Hartler J, Van Den Bergh T, Joosten HJ, Gruber-Khadjawi M, Thallinger GG, Birner-Gruenberger R, Gruber K, Winkler M, Glieder A. *Sci Rep*, 2017, 7: 46738
- 40 Hickel A, Heinrich G, Schwab H, Griengl H. *Biotechnol Tech*, 1997, 11: 55–58
- 41 Zheng YC, Xu JH, Wang H, Lin GQ, Hong R, Yu HL. *Adv Synth Catal*, 2017, 359: 1185–1193
- 42 Isobe K, Kitagawa A, Kanamori K, Kashiwagi N, Matsui D, Yamaguchi T, Fuhshuku K, Semba H, Asano Y. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82: 1760–1769
- 43 Guterl JK, Andexer JN, Sehl T, von Langermann J, Frindi-Wosch I, Rosenkranz T, Fitter J, Gruber K, Kragl U, Eggert T, Pohl M. *J Biotechnol*, 2009, 141: 166–173
- 44 Hughes J, Decarvalho JPC, Hughes MA. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 311: 496–502
- 45 Smitskamp-Wilms E, Brussee J, van der Gen A, van Scharrenburg GJM, Sloothaak JB. *Recl Trav Chim Pays-Bas*, 1991, 110: 209–215
- 46 Motojima F, Nuyler A, Asano Y. *FEBS J*, 2018, 285: 313–324
- 47 Ueatrongchit T, Tamura K, Ohmiya T, H-Kittikun A, Asano Y. *Enzyme Microb Tech*, 2010, 46: 456–465
- 48 Bové C, Conn EE. *J Biol Chem*, 1961, 236: 207–210
- 49 Agarwalla H, Gangopadhyay M, Sharma DK, Basu SK, Jadhav S, Chowdhury A, Das A. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 9148–9156
- 50 Andexer J, Guterl JK, Pohl M, Eggert T. *Chem Commun*, 2006, 40: 4201–4203
- 51 Krammer B, Rumbold K, Tschemmerneegg M, Pöchlauer P, Schwab H. *J Biotechnol*, 2007, 129: 151–161
- 52 Liu Z, Pscheidt B, Avi M, Gaisberger R, Hartner FS, Schuster C, Skranc W, Gruber K, Glieder A. *ChemBioChem*, 2008, 9: 58–61
- 53 Zheng YC, Ding LY, Jia Q, Lin Z, Hong R, Yu HL, Xu JH. *ChemBioChem*, 2021, 22: 996–1000
- 54 Wiedner R, Kothbauer B, Pavkov-Keller T, Gruber-Khadjawi M, Gruber K, Schwab H, Steiner K. *ChemCatChem*, 2015, 7: 325–332
- 55 Lu W, Chen P, Lin G. *Tetrahedron*, 2008, 64: 7822–7827
- 56 Lu W. Application and characterization of plant cyanogen-related enzymes in organic chemistry. *Dissertation for the Doctoral Degree*. Shanghai: Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 2006 (in Chinese) [卢文芽. 植物生氰作用相关酶在有机化学中的应用和表征. 博士学位论文. 上海: 中国科学院上海有机化学研究所, 2006]
- 57 Hashmi ASK, Ata F, Haufe P, Rominger F. *Tetrahedron*, 2009, 65: 1919–1927
- 58 Purkarthofer T, Pabst T, van den Broek C, Griengl H, Maurer O, Skranc W. *Org Process Res Dev*, 2006, 10: 618–621
- 59 Han S, Chu C, Wei P. *Fine Chem*, 2008, 25: 1106–1109 (in Chinese) [韩世清, 褚朝森, 韦萍. 精细化工, 2008, 25: 1106–1109]
- 60 Zheng YC, Li FL, Lin Z, Lin GQ, Hong R, Yu HL, Xu JH. *ACS Catal*, 2020, 10: 5757–5763
- 61 Roos J, Stelzer U, Effenberger F. *Tetrahedron-Asymmetry*, 1998, 9: 1043–1049
- 62 Lauble H, Förster S, Michlich B, Wajant H, Effenberger F. *Acta Crystlogr D Biol Crystlogr*, 2001, 57: 194–200
- 63 Bühler H, Effenberger F, Förster S, Roos J, Wajant H. *ChemBioChem*, 2003, 4: 211–216
- 64 Effenberger F, Jäger J. *J Org Chem*, 1997, 62: 3867–3873
- 65 Caira MR, Hunter R, Nassimbeni LR, Stevens AT. *Tetrahedron-Asymmetry*, 1999, 10: 2175–2189
- 66 Effenberger F, Eichhorn J, Roos J. *Tetrahedron-Asymmetry*, 1995, 6: 271–282
- 67 Pscheidt B, Avi M, Gaisberger R, Hartner FS, Skranc W, Glieder A. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 2008, 52-53: 183–188

- 68 Pscheidt B, Liu Z, Gaisberger R, Avi M, Skranc W, Gruber K, Griengl H, Glieder A. *Adv Synth Catal*, 2008, 350: 1943–1948
- 69 Lanfranchi E, Grill B, Raghoobar Z, Van Pelt S, Sheldon RA, Steiner K, Glieder A, Winkler M. *ChemBioChem*, 2018, 19: 312–316
- 70 Lima DP. *Quim Nova*, 1999, 22: 375–381
- 71 Weis R, Gaisberger R, Skranc W, Gruber K, Glieder A. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 4700–4704
- 72 Purkarthofer T, Gruber K, Gruber-Khadjawi M, Waich K, Skranc W, Mink D, Griengl H. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 3454–3456
- 73 Bekerle-Bogner M, Gruber-Khadjawi M, Wiltse H, Wiedner R, Schwab H, Steiner K. *ChemCatChem*, 2016, 8: 2214–2216
- 74 Rao DHS, Padhi SK. *ChemBioChem*, 2019, 20: 371–378
- 75 Vishnu BP, Sreenivasa DHR, Gilani R, Lata S, Rai N, Akif M, Kumar SP. *Bioorg Chem*, 2022, 120: 105594
- 76 Leemans L, van Langen L, Hollmann F, Schallmeyer A. *Catalysts*, 2019, 9: 522
- 77 Brahma A, Musio B, Ismayilova U, Nikbin N, Kamptmann S, Siegert P, Jeromin G, Ley S, Pohl M. *Synlett*, 2016, 27: 262–266
- 78 Gröger H. *Adv Synth Catal*, 2001, 343: 547–558
- 79 Sosedov O, Matzer K, Bürger S, Kiziak C, Baum S, Altenbuchner J, Chmura A, van Rantwijk F, Stolz A. *Adv Synth Catal*, 2009, 351: 1531–1538
- 80 van Rantwijk F, Stolz A. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 2015, 114: 25–30
- 81 van Pelt S, van Rantwijk F, Sheldon RA. *Adv Synth Catal*, 2009, 351: 397–404
- 82 Zhang W, Fueyo EF, Hollmann F, Martin LL, Pesic M, Wardenga R, Höhne M, Schmidt S. *Eur J Org Chem*, 2019, 2019: 80–84

Recent progress in hydroxynitrile lyases: utilization in the synthetic chemistry

Yu-Cong Zheng, Hui-Lei Yu^{*}, Jian-He Xu^{*}

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Shanghai Collaborative Innovation Center for Biomanufacturing, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

^{*}Corresponding authors (email: jianhexu@ecust.edu.cn; huileiyu@ecust.edu.cn)

Abstract: As one of the few biocatalysts which can catalyze asymmetric C–C bond formation, hydroxynitrile lyases have emerged as attractive biocatalysts in terms of their high chemo- and enantioselectivity for the synthesis cyanohydrins and β -nitro alcohols under mild conditions. With the enabling technology on molecular biology and protein engineering, the application of hydroxynitrile lyases in asymmetric synthesis has been greatly expanded. We herein summarized the basic traits and principles of biocatalytic asymmetric hydrocyanation and nitroaldol reactions. In addition, the representative examples of recent biocatalytic asymmetric synthesis of bioactive compounds *via* hydrocyanation or nitroaldol reaction as key steps are exemplified, and the future directions are briefly discussed.

Keywords: hydroxynitrile lyase, chiral cyanohydrin, asymmetric catalysis, unnatural substrates, protein engineering

doi: [10.1360/SSC-2022-0217](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0217)