

综述



高向东, 中国药科大学教授, 博士生导师, 国务院学位委员会第六届、第七届学科评议组药学组成员, 教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会委员等。主要研究方向为生物新药研制和衰老的分子生物学研究, 主持国家自然科学基金、国家863项目、国家重大新药创制等国家及省部级课题30余项, 实现成果转化3项, 获新药临床批件2项。

酶的分子改造及其在医药领域的应用

毛 杨, 杜怡萱, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210000)

摘要: 酶是由活细胞产生的、对其底物具有高度特异性和高度催化效能的蛋白质或核糖核酸。酶作为一种优秀的生物催化剂, 具有高专一性、反应条件温和、绿色环保等优点。然而天然酶存在稳定性差、活性低等问题, 因此对酶的改造显得尤为重要。本文回顾了定向进化、理性及半理性设计等传统的发展较为成熟的酶分子改造技术; 同时, 简述了机器学习在扩展酶改造设计技术上新的可能性; 并简要介绍了酶在医药领域中的应用, 主要包括药物制备、生化分析和疾病诊断与治疗; 希望能为酶的改造及应用提供更广阔的视野。

关键词: 酶; 定向进化; 理性设计; 半理性设计; 机器学习; 医药应用

Enzyme molecular modification and its application in medicine

MAO Yang, DU Yixuan, GAO Xiangdong*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China)

Abstract: Enzymes, proteins or ribonucleic acids, produced by living cells, exhibit high substrate specificity and catalytic activity. As excellent biocatalysts, they offer advantages such as high specificity, mild reaction conditions, and environmental friendliness. However, natural enzymes suffer from poor stability and low activity levels, so the modification of enzymes is particularly important. This paper reviews traditional and well-developed enzyme molecular modification techniques, including directed evolution, rational and semi-rational design. Meanwhile, machine learning offers new possibilities in expanding enzyme modification techniques. Furthermore, this paper also provides a brief overview about the application of enzymes in medical field including drug production, biochemical analysis, disease diagnosis and treatment. This review is hoped to improve the vision of enzyme molecular modification and its application.

Key Words: enzyme; directed evolution; rational design; semi-rational design; machine learning; medical application

收稿日期: 2024-05-17

第一作者: E-mail: 18695035466@163.com

*通信作者: E-mail: xdgao@cpu.edu.cn

酶是由活细胞产生的、对其底物具有高度特异性和高度催化效能的蛋白质或核糖核酸, 又被称为生物催化剂^[1]。作为生物催化剂, 酶在生物体的诸多过程中发挥着重要作用。Babbi等^[2]通过对《京都基因与基因组百科全书》中收录的生物学通路分析发现, 共有6 904种蛋白质参与了320条KEGG通路, 而其中酶蛋白占比为32%, 共有2 258种。由此可见, 酶在生物体生命活动过程中的重要性。因此, 基因发生突变导致酶活性降低或缺乏可能会导致一些疾病的发生, 如苯丙酮尿症是一种由编码苯丙氨酸羟化酶基因突变造成酶活性缺陷的常染色体隐性遗传病, 患者体内苯丙氨酸异常积累导致脑功能障碍^[3]。所以通过对酶分子化学结构及催化机制的研究将有助于理解疾病的发病机制, 更好地将酶应用于疾病的治疗。

除了在生物体中具有重要作用, 酶在工业生产中也具有广泛应用。漆酶可用于造纸工业中对纸浆进行生物漂白^[4]; β -半乳糖苷酶在乳制品工业中用于生产无乳糖产品^[5]; 脂肪酶也被应用于洗涤剂、食品、造纸以及动物饲料等行业^[6]。酶催化反应高水平的区域立体选择性和高效性使酶在工业生产中的应用前景十分广阔, 但是仍然存在一些限制酶应用的问题。在酶与底物的相互作用过程中, 酶易受到环境中温度、pH值、金属离子等影响, 导致其分子结构的改变以及反应速率的减慢。此外, 工业生产中需要的酶是高温稳定性、高pH稳定性和有机溶剂耐受性, 显然天然酶不具备这些优点。因此, 亟需通过对酶分子在其氨基酸序列水平上进行工程设计, 以优化关键特性, 如表达量、稳定性、底物范围和催化效率, 甚至解锁其在自然界中没有的新催化活性, 从而获得高产率酶的突变体^[7]。本文就定向进化、理性与半理性设计以及机器学习几种酶分子改造技术及其在医药领域的应用进行综述。

1 酶催化反应的化学基础

酶因能加速化学反应而在工业生产中被广泛应用, 最高能将反应速率加速 10^7 倍以上^[8]。科学家们也一直在寻求了解酶催化反应的详细机理以及显著提高酶催化效率的因素。酶催化的第一个理

论是“lock and key”模型, 认为酶与底物的相互作用就像钥匙和锁一样具有严格的互补关系^[9]。此后, Koshland^[10]对锁钥模型进行修改, 提出“induced-fit”理论, 认为酶分子与底物的结合是动态的契合, 当酶接近底物时, 酶分子受底物分子的诱导, 其构象发生有利于同底物结合的变化, 在此基础上进行互补契合。紧接着又出现了“transition-state”理论, 该理论认为, 酶优先与过渡态中间体结合, 而不是底物或产物, 通过降低过渡态的自由能, 从而减少活化所需的能量, 实现加速反应^[11]。上述理论是将酶作为一个选择性识别和结合其底物的结构支架, 当底物结合和适当定位以后, 酶被认为创建一个反应的微环境, 其性质与在本体溶剂中有着显著不同, 并且有利于反应比在溶液中更快地进行^[12]。

近年来, 研究人员不再将酶视为一个刚性结构支架, 转而提出酶是一个灵活的分子, 内部运动在酶催化反应中起着积极的作用^[13]。通过对肽基脯氨酰顺反异构酶等催化完全不同生化反应的三类酶的计算研究发现, 在不同酶折叠的远端区域存在蛋白质运动, 这些运动与介导酶活性位点-底物相互作用的变化类似, 从而影响反应机制。在酶催化的动态过程中, 酶分子的原子位置在催化过程中以时间依赖性方式发生变化; 并且这种时间依赖性的尺度范围很广, 从皮秒和纳秒到微秒和毫秒^[14]。此外, 多种技术为各个时间尺度上的酶分子动力学运动提供了深刻的见解, 包括核磁共振实验^[15]、单分子技术^[16]、氘氘交换^[17]、中子散射^[18]和计算技术^[19]等。但是内部运动在加快酶促反应速率中的作用仍不完全清楚, 需要进一步研究。

2 酶分子改造

酶作为生物催化剂, 具有反应条件温和、绿色环保等优点, 但天然酶存在催化底物类型有限、立体区域选择性不高等缺点。随着重组DNA技术的发展, 能够对基因进行改造并在合适的宿主中大量表达, 从而获得比天然来源更多的酶。测序技术的发展使得对酶分子中的氨基酸残基进行改造及其与酶功能之间的相关性研究成为可能。因此, 对天然酶进行设计改造, 提升其工业应用属

性,具有重要的基础研究意义及应用价值。目前已经建立的酶分子优化的策略包括定向进化、理性设计、半理性设计,以及近年来出现的机器学习。

2.1 定向进化

酶的定向进化技术是模仿自然进化中基因突变与自然选择的过程,通过向基因引入突变,并直接或间接对突变体进行筛选,经过多轮迭代,最终得到酶活性提高、底物特异性改进、酶热稳定性提高等符合预期的突变体^[20]。2018年,Arnold等三位教授也因在定向进化领域的贡献获得了诺贝尔化学奖^[21]。定向进化的关键是构建突变体文库并从中筛选满足特定需求的目标突变体,目前常用的引入突变的方法包括随机诱导突变^[22]、易错PCR和体外DNA重组^[23]等。定向进化作为传统酶分子改造技术,在生物催化剂立体选择性等参数改造中已取得了一定成就。Longwitz等^[24]通过在乳酸乳球菌多药耐药性调节因子中引入非典型氨基酸硼酸苯丙氨酸而产生硼酸依赖性脲合酶,然后通过诱导突变和定向进化,筛选获得具有足够催化活性和立体选择性的突变体,从而弥补小分子催化剂硼酸没有立体选择性的缺点。此外,在西格列汀的生产工艺中,Savile等^[25]通过计算机设计和定向进化相结合获得转氨酶变体,用于合成手性胺,在经过11轮进化筛选后,最终催化剂包含27个突变,并且能够耐受工艺中的高温和各种有机助溶剂,大大提高了生产效率。定向进化除了在酶催化领域的应用以外,在抗体和高亲和力配体的筛选中也具有重要作用。Grindel等^[26]通过将mRNA展示技术和定向进化的手段获得程序性死亡配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)的亲本体M1,并且在后续的细胞功能检测中,发现M1在低微摩尔浓度下能够抑制PD-L1的信号传导。由此可见,定向进化已被应用于酶和蛋白质进化的各个领域,其核心问题在于如何构建精准突变体库、提高进化效率、提高筛选与选择速度。

2.2 理性设计

理性设计是通过预测酶分子活性位点并考察特定定位点突变对其稳定性、折叠及与底物结合等方面的影响,从而针对性地对酶进行改造和模拟筛

选^[27]。虽然定向进化在酶分子改造中取得了一定的成就,其关键挑战是建立一个能有效地识别所需的表型并以高通量的方式分析目标产物的通用平台,因此想要得到更优化的酶的结构序列往往伴随着的是更大的筛选工作量^[20]。在理性设计中会基于蛋白质的三维结构,结合酶催化机制,以理性的方式选取拟改造活性位点及构建单元,通过定点突变构建更小的突变体文库来克服筛选瓶颈,从而准确地预测蛋白质结构和产生自然界没有的新酶^[28]。在自然界中二氧化碳的固定依赖于光系统 I——一种巨大的膜蛋白复合物。有研究设计出一种33 kDa的微型光催化CO₂还原酶,该酶含有一个发色团的光敏蛋白域和两个铁硫簇的催化域,最终使光驱动CO₂到甲酸转换的量子效率达到1.43%,并且能够在大肠杆菌中过表达^[29]。此外,手性杂环化合物在药物合成和材料领域中具有重要作用。Li等^[30]通过对柠檬烯环氧水解酶底物结合口袋活性位点进行计算设计,重构其活性中心氢键网络,打破原有依赖水分子对环氧底物的开环机制,实现了其催化环氧化合物的鲍德温环化反应与去对称化反应,并合成了多种手性氮/氧杂环化合物,可用于构建系列天然产物以及潜在药物前体。Tian等^[31]通过对HAD磷酸酶的底物偏好进行理性设计得到了几种变体,分别表现出对6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖和6-磷酸甘露糖三种磷酸化糖增强的特异性和催化效率。

理性设计构成了从头蛋白质设计的基础,并且由于生成的文库尺寸较小,是一种有吸引力的策略。但是它可能需要对蛋白质结构、机制和序列有广泛的了解,才能产生更好的变体^[32]。

2.3 半理性设计

半理性设计是随机突变酶分子中对酶性质起重要作用的一些位点或特定区域,以快速获得具有改变酶性质的突变酶。在不影响突变效应的前提下,该方法可以缩小突变库的大小,显著提高酶分子改造的效率^[33]。半理性设计常用策略包括组合活性中心饱和和突变(combinatorial active-site saturation test, CAST)^[34]、迭代饱和和突变(iterative saturation mutagenesis, ISM)^[35]和理性聚焦迭代突变技术(focused rational iterative site-specific mutagenesis, FRISM)^[36]等。CAST核心是基于序列

或结构信息, 借助计算机模拟在酶催化活性中心周围选取与底物有直接相互作用的氨基酸残基来构建突变库。一般情况下, 单轮突变难以达到预期效果, 常需要多轮叠加突变。Yu等^[37]利用CAST/ISM策略对P450单加氧酶P450-BM3进行迭代饱和突变, 经过3轮筛选使其催化苯乙烯环氧化的对映体选择性大大提高。FRISM的核心是鉴定酶分子中的突变残基和在突变位点上引入合适的氨基酸, 区别于CAST/ISM, FRISM一般不会构建饱和和诱变文库, 每个位点的突变只涉及3~5个氨基酸^[38]。Li等^[39]利用FRISM技术将糖基转移酶UGT74AC2生成三个区域互补变体, 能够分别催化黄酮类化合物水飞蓟宾生成3-O-葡萄糖苷、7-O-葡萄糖苷和3,7-O-双葡萄糖苷混合产物。此外, Lei等^[40]也通过理性聚焦迭代位点特异性突变的策略, 将催化狄尔斯-阿尔得反应的酶MaDA1中五个氨基酸残基进行FRISM实验, 最终得到MaDA1_M3变体, 能够将催化效率提高34倍且具有良好的立体选择性。

半理性设计通过选定一定区域中的氨基酸位点进行突变, 与定向进化相比降低了突变库的大小; 相较于理性设计, 不需要对酶分子结构与功能之间的关系有精确的了解。但是, 半理性设计在一定程度上还是依赖于变体文库的构建和突变体的筛选, 虽然取得了巨大成果, 仍然需要大量的计算和实验工作。

2.4 机器学习

随着新一代测序技术、高通量筛选方法、蛋白质改造数据库和人工智能的发展, 以数据驱动的机器学习(machine learning, ML)成为优化生物催化剂的新方法。机器学习是通过输入特定的数据集, 识别现有的数据模式, 以预测以前没有但和数据集具有相似属性的分子。其中, 输入的数据被称为训练集, ML的本质是在训练集中查找可用属性, 包括酶分子序列、空间结构和理化性质等。机器学习的两种主要类型是无监督学习和监督学习。在无监督学习中, 目标是将高维数据压缩成较少的维数, 或者找到数据聚类。在监督学习中, 一个或多个目标属性被指定为标签, 目标通过学习产生一个能预测非标签数据的函数^[41]。

目前多种算法已被用于ML, 包括随机森林(random

forests, RF)^[42]、支持向量机(support vector machine, SVM)^[43]、决策树(decision tree, DT)^[44]以及K最近邻(K-nearest neighbor, KNN)^[45]等。ML可用于数据库中对蛋白质结构与功能的注释以及用于发现所需功能的酶和蛋白质。如在代谢工程中利用脂肪酰基还原酶(alcohol-forming fatty acyl reductases, FAR)、在细胞内利用酰基辅酶A和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)产生脂肪醇, 但是酶活性是高通量生产的主要瓶颈。Greenhalgh等^[46]通过ML驱动的方法设计出在底物ACP上具有增强活性的FAR。此外, 聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)水解酶一般只在高温时才会表现出水解能力, 在较低温度以及中性pH条件下活性较弱。Lu等^[47]通过基于蛋白质序列结构的ML设计出一种突变型, 最大水解活性提升了38倍, 并能够在较低温度以及中性pH环境中保持高活性的PET水解酶, 大大提高了其对PET垃圾的降解能力。不仅如此, ML还被用于预测蛋白质溶解性^[48]、最适反应温度^[49]以及酶的催化残基框架^[50]等。

机器学习在酶分子的改造中表现出强大的潜力, 但是目前尚存在许多挑战。由于ML对数据的严重依赖性, 目前最丰富的是蛋白质结构和序列数据库, 但是关于酶分子反应机理、底物的特异性、对映体的选择性及辅因子等的数据库尚少。此外, 还有许多在实验中性能不佳的突变体数据丢失, 导致机器学习缺少阴性数据。因此, 在未来构建更全面、更均衡、更高质量的数据库对于机器学习的发展尤为重要。

3 酶在生物医药领域中的应用

3.1 药物制备

酶作为生物催化剂, 就其催化的化学反应类型而言, 包括氧化还原、水解、异构化以及基团转移等, 结合生物催化的优点使其高度适用于药物制备中许多化学转化反应^[51]。根据全球工业酶市场的分析报告, 在2024–2030年的预测期内, 全球工业酶市场预计将以6.8%的复合年增长率增长; 其中食品和饮料行业占据主导地位, 但由于制药行业的发展, 预计其份额占比会出现增长趋势^[52]。目前已有多种酶被应用于制备药物中间体

和药物合成。L-酪氨酸苯酚裂解酶可以催化邻苯二酚、丙酮酸和氨生成左旋多巴,后者是治疗帕金森氏病的首选药物^[53]。Pei等^[54]通过对芽孢杆菌属中获得的醛酮还原酶AKR3-2-9进行催化位点的分析发现,其能够催化抗抑郁药度洛西汀关键中间体合成。Zhang等^[55]通过对亚胺还原酶进行结构改造从而实现利用该酶的变体完成多个药物分子以及中间体的高效合成。

此外,随着合成生物学的发展,利用微生物细胞工厂制备药物成为可能。Zhang等^[56]通过对酵母菌细胞进行基因重编程以实现30多个酶促反应,改造后的酵母菌能够生产文多林和长春花碱。这两种物质是合成抗癌药物长春碱的重要前体。Yang等^[57]通过采用五种工程酶和四种辅酶多酶级联反应实现了抗艾滋病药物伊斯拉曲韦的合成。目前,酶已经成功取代了许多基于传统化学催化剂的药物合成,并且随着酶工程技术的发展,其在合成抗生素、氨基酸以及核苷酸等生物小分子药物方面扮演着越来越重要的角色。

3.2 生化分析及疾病诊断

近年来,由于酶促反应的专一性和高效性使其在生化分析和疾病诊断中应用广泛。酶法分析是以酶为分析工具,旨在测量生物物质的活性和浓度,大多数酶法测定基于荧光或分光光度法终点信号的检测^[58]。因为酶法分析在测定中的高灵敏度、高特异性和快速反应,使其在疾病诊断中具有重要价值,其在疾病诊断中的应用主要分为两方面。一方面是对机体酶活性及浓度的测定,某些疾病的发生会导致其改变。天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)血清水平可用于诊断心脏和肝脏病变,在肝损伤的情况下AST血清水平会上升^[59]。明胶酶是将明胶转化为多肽和小分子物质的蛋白水解酶。明胶酶的催化产物可进一步用于各种代谢途径。Gopcevic等^[60]发现,明胶酶A和明胶酶B可作为急性心肌梗死早期检测的标志物。丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BChE)是一种丝氨酸水解酶,可催化体内酯的水解。Zivkovic等^[61]发现, BChE活性降低是创伤诱发的急性全身炎症反应的早期指标。另一方面,除了对酶本身的检测,酶法分析还可以用于分析体内特定的物质,如基于酶的生物传感器的发

展。目前已开发了大量酶的生物传感器来提供有关患者健康状况的诊断信息。Calabria等^[62]开发了基于化学发光系统测定葡萄糖氧化酶催化葡萄糖氧化产生过氧化氢,从而定量检测血液样本中的葡萄糖的方法。Tiwari等^[63]开发了一种基于共价固定化脲酶的电化学尿素生物传感器,可用于体液中尿素浓度的检测。

目前,酶在实验室的生化分析和临床疾病诊断中有重要作用,但是在诊断市场上对酶的需求和供应之间存在差距,需要开发更好的疾病诊断分析方法和更好的酶和酶生产系统,弥补供需之间的缺口^[64]。

3.3 疾病治疗

酶是生物系统的催化剂,对于体内能量代谢、信息传递及增殖分化有重要作用,其活性的变化与疾病的发生密切相关。目前在人体中共发现1494种酶与2539种遗传疾病有关^[65],因此酶是疾病治疗的重要靶点,同时也可以直接作为药物用于疾病治疗^[66]。目前,酶类药物已成为生物药物的重要组成部分,已被广泛用于代谢缺陷症、心血管疾病、炎症感染、癌症等疾病的治疗^[67]。

现在越来越多的酶类药物被批准用于疾病的治疗,如苯丙酮尿症中过量的苯丙氨酸,能够被苯丙氨酸氨解酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)催化成无毒无害的反式肉桂酸和氨,反式肉桂酸被进一步代谢最后以马尿酸的形式随尿液排出。由于PAL催化反应生成无毒化合物,所以PAL被认为是治疗苯丙酮尿症的一种药物^[68]。此外,溶酶体酸性脂肪酶缺乏症(lysosomal acid lipase deficiency, LALD)由于其基因突变导致酸性脂肪酶不能在溶酶体中降解低密度脂蛋白、胆固醇酯和三酰甘油,导致胆固醇酯和三酰甘油在体内蓄积引起内脏器官黄瘤样病变^[69],而重组人溶酶体酸性脂肪酶成为首款治疗LALD的药物^[70]。表1总结了部分用于疾病治疗的酶类药物。酶类药物由于高度的底物靶向性和亲和力,不会作用于其他底物而降低了不良反应;另外,酶类药物用量少,降低了药物使用风险^[71]。但酶类药物也存在容易失活和半衰期短等缺点^[67]。为了发挥其最大效能,需要与酶的化学修饰、靶向递送和借助药物载体等手段相结合使用。

表 1 部分用于治疗疾病的酶

治疗用酶	治疗疾病	治疗机制
L-天冬酰胺酶	急性淋巴细胞白血病	水解L-天冬酰胺形成天冬氨酸和氨，肿瘤细胞因无法合成L-天冬酰胺而死亡 ^[72]
精氨酸酶	肝细胞癌等恶性肿瘤	肿瘤细胞对于精氨酸具有依赖性，分解精氨酸以抑制肿瘤细胞的生长 ^[73]
尿激酶	血栓血管疾病	纤溶酶原激活剂，促进纤溶酶原转化为纤溶酶 ^[74]
β-D-半乳糖苷酶	乳糖不耐受	去除饮食中的乳糖，减轻乳糖不耐受症状 ^[75]
胶原蛋白酶	烧伤创面清创等	水解胶原蛋白，促进创面愈合 ^[76]
腺苷氨基水解酶	重症联合免疫缺陷病	水解细胞嘌呤代谢产物腺苷以降低其浓度 ^[77]
舍雷肽酶	抗炎等	抑制发炎组织中的疼痛诱导胺的释放 ^[78]
木瓜蛋白酶	过敏等损伤	半胱氨酸水解酶 ^[79]

4 挑战及展望

生物技术和酶分子设计技术的发展，大大提高了酶在医药领域的应用，但是仍然存在许多挑战。目前，在BRENDA酶数据库中共记录酶的数量有8 423种(截止至2024年4月)，但是其中应用于疾病治疗的不到一百种^[80]。虽然在食品、农业、工业、环境保护等领域应用的酶数量可能远高于医药领域，但是毫无疑问，仍然有大量酶尚未被开发利用。因此，如何挖掘和设计改造更多可利用的酶分子将是一个重要课题。

当前人工智能发展十分迅速，加速了酶分子定向进化和理性设计等手段的融合，利用人工智能和开发新的机器学习模型已成为酶分子改造的重要趋势。如针对L-天冬酰胺酶(L-asparaginase, ASP)半衰期短的问题，Zhang等^[81]通过基因工程设计了一种类弹性蛋白多肽(elastin-like polypeptide, ELP)融合的L-天冬酰胺酶(ASP-ELP)。这是一种由人工智能模型AlphaFold2预测的核壳结构四聚体，能够克服ASP半衰期短的局限性。此外，新一代人工智能模型AlphaFold3已经推出，其对蛋白质等其他生物分子结构和相互作用的预测达到了一个前所未有的准确度^[82]。未来利用人工智能构建高性能的生物催化剂具有巨大潜力，同时也会极大地促进酶分子的应用。

参考文献

[1] Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*, 2015, 59: 1-41

[2] Babbi G, Baldazzi D, Savojardo C, et al. Highlighting human enzymes active in different metabolic pathways and diseases: the case study of EC 1.2.3.1 and EC 2.3.1.9. *Biomedicines*, 2020, 8(8): 250

[3] van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, et al. Phenylketonuria. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 36

[4] Singh G, Arya SK. Utility of laccase in pulp and paper industry: a progressive step towards the green technology. *Int J Biol Macromol*, 2019, 134: 1070-1084

[5] Mangiagalli M, Brocca S, Orlando M, et al. The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins. *New Biotechnol*, 2020, 55: 5-11

[6] Almeida JM, Alnoch RC, Souza EM, et al. Metagenomics: is it a powerful tool to obtain lipases for application in biocatalysis? *Biochim Biophys Acta*, 2020, 1868(2): 140320

[7] Yan W, Li X, Zhao D, et al. Advanced strategies in high-throughput droplet screening for enzyme engineering. *Biosens Bioelectron*, 2024, 248: 115972

[8] Richard JP. Enzymatic rate enhancements: a review and perspective. *Biochemistry*, 2013, 52(12): 2009-2011

[9] Fischer E. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Ber Dtsch Chem Ges*, 1894, 27(3): 2985-2993

[10] Koshland Jr. DE. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44(2): 98-104

[11] Laidler KJ, King MC. Development of transition-state theory. *J Phys Chem*, 1983, 87(15): 2657-2664

[12] Warshel A, Sharma PK, Kato M, et al. Electrostatic basis for enzyme catalysis. *Chem Rev*, 2006, 106(8): 3210-3235

[13] Agarwal PK. A biophysical perspective on enzyme catalysis. *Biochemistry*, 2019, 58(6): 438-449

[14] Ramanathan A, Agarwal PK, Petsko GA. Evolutionarily conserved linkage between enzyme fold, flexibility, and catalysis. *PLoS Biol*, 2011, 9(11): e1001193

[15] Palmer AG 3rd. Enzyme dynamics from NMR spectroscopy. *Acc Chem Res*, 2015, 48(2): 457-465

[16] Zhang Z, Rajagopalan PTR, Selzer T, et al. Single-molecule and transient kinetics investigation of the interaction of dihydrofolate reductase with NADPH and dihydrofolate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2764-2769

- [17] Závodszy P, Kardos J, Svingor Á, et al. Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (13): 7406-7411
- [18] Tehei M, Franzetti B, Wood K, et al. Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3): 766-771
- [19] Holliday MJ, Camilloni C, Armstrong GS, et al. Networks of dynamic allostery regulate enzyme function. *Structure*, 2017, 25(2): 276-286
- [20] Wang Y, Xue P, Cao M, et al. Directed evolution: methodologies and applications. *Chem Rev*, 2021, 121 (20): 12384-12444
- [21] NobelPrize.org. The Nobel Prize in Chemistry 2018[EB/OL]. (2018-10-03)[2024-05-15]. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>
- [22] Chen K, Arnold FH. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(12): 5618-5622
- [23] Stemmer WPC. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, 1994, 370(6488): 389-391
- [24] Longwitz L, Leveson-Gower RB, Rozeboom HJ, et al. Boron catalysis in a designer enzyme. *Nature*, 2024, 629 (8013): 824-829
- [25] Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science*, 2010, 329 (5989): 305-309
- [26] Grindel BJ, Engel BJ, Ong JN, et al. Directed evolution of PD-L1-targeted affibodies by mRNA display. *ACS Chem Biol*, 2022, 17(6): 1543-1555
- [27] Huang PS, Boyken SE, Baker D. The coming of age of de novo protein design. *Nature*, 2016, 537(7620): 320-327
- [28] Chen H, Ma L, Dai H, et al. Advances in rational protein engineering toward functional architectures and their applications in food science. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(15): 4522-4533
- [29] Kang F, Yu L, Xia Y, et al. Rational design of a miniature photocatalytic CO₂-reducing enzyme. *ACS Catal*, 2021, 11(9): 5628-5635
- [30] Li JK, Qu G, Li X, et al. Rational enzyme design for enabling biocatalytic *Baldwin cyclization* and asymmetric synthesis of chiral heterocycles. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 7813
- [31] Tian C, Yang J, Liu C, et al. Engineering substrate specificity of HAD phosphatases and multienzyme systems development for the thermodynamic-driven manufacturing sugars. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3582
- [32] O'Connell A, Barry A, Burke AJ, et al. Biocatalysis: landmark discoveries and applications in chemical synthesis. *Chem Soc Rev*, 2024, 53(6): 2828-2850
- [33] Dinmukhamed T, Huang Z, Liu Y, et al. Current advances in design and engineering strategies of industrial enzymes. *Syst Microbiol Biomanuf*, 2021, 1(1): 15-23
- [34] Reetz MT, Bocola M, Carballeira JD, et al. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44 (27): 4192-4196
- [35] Acevedo RCG, Hoebenreich S, Reetz MT. Iterative saturation mutagenesis: a powerful approach to engineer proteins by systematically simulating Darwinian evolution. *Methods Mol Biol*, 2014, 1179: 103-128
- [36] Xu J, Cen Y, Singh W, et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(19): 7934-7945
- [37] Yu D, Wang J, Reetz MT. Exploiting designed oxidase-peroxygenase mutual benefit system for asymmetric cascade reactions. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(14): 5655-5658
- [38] Li D, Wu Q, Reetz MT. Focused rational iterative site-specific mutagenesis (FRISM). *Methods Enzymol*, 2020, 643: 225-242
- [39] Li J, Qu G, Shang N, et al. Near-perfect control of the regioselective glucosylation enabled by rational design of glycosyltransferases. *Green Synthesis Catal*, 2021, 2(1): 45-53
- [40] Wang J, Ke H, Yang J, et al. Diversity-oriented synthesis of cyclohexenes by combining enzymatic intermolecular Diels-Alder reactions and decarboxylative functionalizations. *Chem Catal*, 2023, 3(1): 100451
- [41] Mazurenko S, Prokop Z, Damborsky J. Machine learning in enzyme engineering. *ACS Catal*, 2020, 10(2): 1210-1223
- [42] Yang Y, Niroula A, Shen B, et al. PON-Sol: prediction of effects of amino acid substitutions on protein solubility. *Bioinformatics*, 2016, 32(13): 2032-2034
- [43] Folkman L, Stantic B, Sattar A, et al. EASE-MM: sequence-based prediction of mutation-induced stability changes with feature-based multiple models. *J Mol Biol*, 2016, 428(6): 1394-1405
- [44] Huang LT, Gromiha MM, Ho SY. iPTREE-STAB: interpretable decision tree based method for predicting protein stability changes upon mutations. *Bioinformatics*, 2007, 23(10): 1292-1293
- [45] Koskinen P, Törönen P, Nokso-Koivisto J, et al. PANNZER: high-throughput functional annotation of uncharacterized proteins in an error-prone environment. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1544-1552

- [46] Greenhalgh JC, Fahlberg SA, Pfleger BF, et al. Machine learning-guided acyl-ACP reductase engineering for improved *in vivo* fatty alcohol production. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5825
- [47] Lu H, Diaz DJ, Czarnecki NJ, et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, 2022, 604(7907): 662-667
- [48] Hon J, Borko S, Stourac J, et al. EnzymeMiner: automated mining of soluble enzymes with diverse structures, catalytic properties and stabilities. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W104-W109
- [49] Li G, Dong Y, Reetz MT. Can machine learning revolutionize directed evolution of selective enzymes? *Adv Synth Catal*, 2019, 361(11): 2377-2386
- [50] Torng W, Altman RB, Valencia A. High precision protein functional site detection using 3D convolutional neural networks. *Bioinformatics*, 2019, 35(9): 1503-1512
- [51] Meghwanshi GK, Kaur N, Verma S, et al. Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotech App Biochem*, 2020, 67(4): 586-601
- [52] Research and markets. Industrial enzymes market, size, global forecast 2024-2030, industry trends, share, growth, insight, impact of inflation, company analysis[R]. Dublin: Research and markets, 2024: 1-220
- [53] Li T, Li X. Comprehensive mass analysis for chemical processes, a case study on ¹-Dopa manufacture. *Green Chem*, 2014, 16(9): 4241-4256
- [54] Pei R, Wu W, Zhang Y, et al. Characterization and catalytic-site-analysis of an aldo-keto reductase with excellent solvent tolerance. *Catalysts*, 2020, 10(10): 1121
- [55] Zhang J, Liao D, Chen R, et al. Tuning an imine reductase for the asymmetric synthesis of azacycloalkylamines by concise structure-guided engineering. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61(24): e202201908
- [56] Zhang J, Hansen LG, Gudich O, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine. *Nature*, 2022, 609(7926): 341-347
- [57] Huffman MA, Fryszkowska A, Alvizo O, et al. Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science*, 2019, 366(6470): 1255-1259
- [58] Egbuna C. Analytical Techniques in Biosciences: Chapter 12—Enzyme assay techniques and protocols[OL]. 2022:191-199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00012-9>
- [59] Huang XJ, Choi YK, Im HS, et al. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*, 2006, 6(7): 756-782
- [60] Gopcevic K, Rovcanin B, Kekic D, et al. Gelatinases A and B and antioxidant enzyme activity in the early phase of acute myocardial infarction. *Fol Biol*, 2017, 63(1): 20-26
- [61] Zivkovic AR, Bender J, Brenner T, et al. Reduced butyrylcholinesterase activity is an early indicator of trauma-induced acute systemic inflammatory response. *J Inflamm Res*, 2016, Volume 9: 221-230
- [62] Calabria D, Zangheri M, Trozzi I, et al. Smartphone-based chemiluminescent origami μ PAD for the rapid assessment of glucose blood levels. *Biosensors*, 2021, 11(10): 381
- [63] Tiwari A, Aryal S, Pilla S, et al. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, 2009, 78(4-5): 1401-1407
- [64] Pathan SU, Kharwar A, Ibrahim MA, et al. Enzymes as indispensable markers in disease diagnosis. *Bioanalysis*, 2024, 1-13
- [65] Savojardo C, Baldazzi D, Babbi G, et al. Mapping human disease-associated enzymes into Reactome allows characterization of disease groups and their interactions. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 17963
- [66] Robertson JG. Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(6): 674-679
- [67] de la Fuente M, Lombardero L, Gómez-González A, et al. Enzyme therapy: current challenges and future perspectives. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9181
- [68] Wang L, Gamez A, Sarkissian CN, et al. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 2005, 86(1-2): 134-140
- [69] Zandanell S, Primavesi F, Aigner E. Hepatosteatosis from lysosomal acid lipase deficiency. *J Gastrointestinal Surg*, 2019, 23(3): 601-602
- [70] Frampton JE. Sebelipase alfa: a review in lysosomal acid lipase deficiency. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2016, 16(6): 461-468
- [71] Dean SN, Turner KB, Medintz IL, et al. Targeting and delivery of therapeutic enzymes. *Ther Deliv*, 2017, 8(7): 577-595
- [72] Pokrovsky VS, Chepikova OE, Davydov DZ, et al. Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy. *Curr Med Chem*, 2019, 26(3): 446-464
- [73] Patil MD, Bhaumik J, Babykutty S, et al. Arginine dependence of tumor cells: Targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene*, 2016, 35(38): 4957-4972
- [74] Bansal V, Roychoudhury PK. Production and purification of urokinase: a comprehensive review. *Protein Expression Purification*, 2006, 45(1): 1-14
- [75] Dwyer JT. Nutrition in the prevention and treatment of disease. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(3): 696-697
- [76] Salehi SH, Momeni M, Vahdani M, et al. Clinical value of

- debriding enzymes as an adjunct to standard early surgical excision in human burns: a systematic review. *J Burn Care Res*, 2020, 41(6): 1224-1230
- [77] Kutryb-Zajac B, Mierzejewska P, Slominska EM, et al. Therapeutic perspectives of adenosine deaminase inhibition in cardiovascular diseases. *Molecules*, 2020, 25(20): 4652
- [78] Jadhav SB, Shah N, Rath A, et al. Serratiopeptidase: insights into the therapeutic applications. *Biotechnol Rep*, 2020, 28: e00544
- [79] Benjamin B, Akinwande A, Otunba A, et al. Therapeutic benefits of Carica papaya: a review on its pharmacological activities and characterization of papain. *Arab J Chem*, 2023, 17
- [80] BRENDA Enzyme database. All enzymes in BRENDA. [EB/OL]. (2024-04-30)[2024-05-15].<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>
- [81] Zhang S, Sun Y, Zhang L, et al. Thermoresponsive polypeptide fused l-asparaginase with mitigated immunogenicity and enhanced efficacy in treating hematologic malignancies. *Adv Sci*, 2023, 10(23): 2300469
- [82] Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500