

酶促不对称催化手性合成系统研究进展

李伟翔, 李 春, 刘桂艳, 戴大章

(北京理工大学 生命科学学院, 北京 100081)

关键词: 手性化合物; 酶促催化; 不对称合成

中图分类号: TQ931

文献标志码: A

手性化合物由于具有特殊的立体结构, 其对映体常表现出不同的物理化学特性和生理活性, 近年来在新材料开发、新药设计、精细化学品合成等领域中发挥重要作用. 手性化合物的传统制备方法是化学法, 即利用手性配体或前体和催化剂(常为过渡金属)等来进行不对称合成. 但由于这些方法存在试剂昂贵、反应条件苛刻(高温高压与强酸强碱)、光学纯度低等缺点, 难于适应实际工业生产的要求^[1]. 与传统化学合成法相比, 生物酶法不对称催化的手性合成具有选择性强、反应条件温和、环境友好等优点而深受青睐^[2]. 具有高度选择性的生物制造技术尤其适用于高光学纯度化学品的制造过程, 大力发展手性化学品生物制造技术, 符合国家重大需求, 也是实现绿色制造的重要手段^[3].

由于迅猛的社会需求以及化学合成法的局限性, 采用生物酶法催化的不对称合成反应制备手性化合物尤其是手性药物及其中间体的技术得到了蓬勃发展和广泛关注, 基于酶催化的手性合成系统也先后建立起来. 我们结合近年来文献报道情况, 将近年来发展起来的酶促不对称催化系统分为单酶催化系统、多酶联用系统以及化学法/酶法集成系统3大类, 下面对这3大手性酶促催化系统的特点及其具体应用开发进展情况分别进行介绍.

1 单酶催化系统

生物酶类可以大致分水解酶、氧化-还原酶、转移酶、裂合酶、异构酶、连接酶、核酸酶七大类, 手性催化中用得较多的主要是水解酶和氧化还原酶. 其中水解酶中的脂肪酶与酯酶多用于手性拆分, 氧

化-还原酶的醛酮还原酶、脱氢酶则是酶催化不对称合成则是当前酶促不对称催化研究的重点, 最近转氨酶(转移酶)应用于手性合成的高价值研究文章也较为多见^[4].

1.1 水解酶

水解反应在酶催化手性合成中应用最为广泛, 通过酶立体选择性水解酯、环氧化物、腈类和酰类化合物等得到光学纯的单一异构体. 而水解反应的逆反应中的酰化反应则一般通过酰化含有潜在手性中心的化合物或立体选择性酰化消旋体中的一个异构体来生成手性酰类化合物. 这两类反应目前研究较多, 应用也较为广泛. 水解反应多用于酶法动力学拆分, 是利用立体选择性酶类催化外消旋底物的两个不同对映体时的酶促反应速度的差异而实现对映体拆分的一种方法. 由于反应速度较快的对映体先转化为产物, 而反应速度较慢的对映体则基本以原型保留, 从而实现手性拆分^[5].

酯酶是水解酶研究中, Alécia 等^[6]通过检测产物的旋光度从各种新鲜水果蔬菜组织中筛选出红甜菜根部细胞中对1-苯乙基乙酸酯(OAc)具有对映体选择性的水解酶, 转化率达到68%, (*S*)-OAc的对映体过量值(ee)高达100%(见图1). 魏晓飞等^[7]以来源于 *Aeropyrum pernix* 的嗜热酯酶 APE1547 为酶源, 氯仿为溶剂, 催化二乙基锌与4-Cl-苯甲醛的加成反应, 加成反应生成的光学活性醇产率最高达78%, ee值最高可达56%; Rui 等^[8]利用相同的酶在离子液体中催化(*R/S*)-2-甲基-1-丁醇进行不对称酯基转移反应, E>25. 侯雪丹等^[9]在丙酮-四氢呋喃(85/15, 体积比)混合溶剂体系中, 利用固定化脂肪酶

收稿日期: 2014-02-20; 修回日期: 2014-09-23.

基金项目: 国家自然科学基金(21276025).

作者简介: 李伟翔(1989-), 男, 硕士生.

* 通讯联系人, 戴大章 Email: daidazhang@bit.edu.cn.

Lipozyme TLIM 催化合成 5-氟尿苷 5'-棕榈酸酯, 5'位的区域选择性达到 99%, 填充床反应器重复使用 10 批次后, 产物收率仍可达 97%. 以上研究进一步拓展了酯酶的非专一性与应用范围.

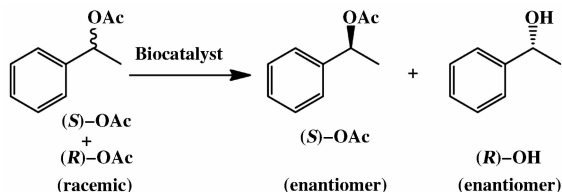


图 1 利用生物催化剂动力学拆分外消旋 1-苯乙基乙酸酯

Fig.1 Kinetic resolution of racemic 1-phenylethyl acetate by biocatalysts

利用环氧化物水解酶催化外消旋环氧化物水解得到的光学活性环氧化物和邻位二醇已是获得许多生物活性分子前体的一条重要途径. Bala 等^[10]利用来自 *Bacillus alcalophilus* MTCC10234 内的水解酶拆分苯基缩水甘油醚衍生物, 以 1, 2-环氧-3-苯氧基丙烷为底物, 得到 (S)-1, 2-环氧-3-苯氧基丙烷与 (R)-3-(苯氧基)丙烷-1, 2-二醇, 前者的 ee 值达到 99% 以上. Sheng 等^[11]利用来源于 *Botryosphaeria dothidea* ZJUZQ007 的环氧化物水解酶可高对映体选择性地催化缩水甘油醚类环氧化物水解, 产物 ee 值可达 91% ~ 99%. Kotik 等^[12]利用来自黑曲霉 M200 突变体的环氧化物水解酶催化外消旋的 1-苯基环氧乙烷制备 (R)-苯基-1, 2-乙二醇, ee 值达到 91%. Kotik 等^[13]还利用定向进化的方法提高环氧化物水解酶 Kau2 的对映体选择性, 催化外消旋对氯苯乙烯氧化物水解, 进行对映体收敛, 得到 (R)-对氯苯基-1, 2-乙二醇, ee 值高达 97%, 转化率达到 50%.

酶催化的不对称酰化反应则常用来引入手性因素, 如 Irimescu R 等^[14]在无溶剂体系内利用南极假丝酵母脂肪酶 B (CAL-B) 催化 4-戊烯酸与 2-甲氧基-2-苯乙醇进行不对称酯化, 产物 R 型 1-甲基-1-甲氧基-1-苯基-4-戊烯酸甲酯, ee 值达到 93.6%. Sylwia 等^[15]利用南极念珠菌脂肪酶 (CAL-B) 拆分外消旋 2-羟基甲基苯基 (甲基) 苯基氧化膦, 获取具有手性中心的 R 型产物, 产率达到 80%, e. e. 值可达 98% 以上, 反应过程如图 2.

腈类化合物是有机合成中重要的中间体, 它的生物不对称水解与传统化学合成手段具有良好的互补性, 研究意义重大. Xu 等^[16]利用能表达腈水解酶

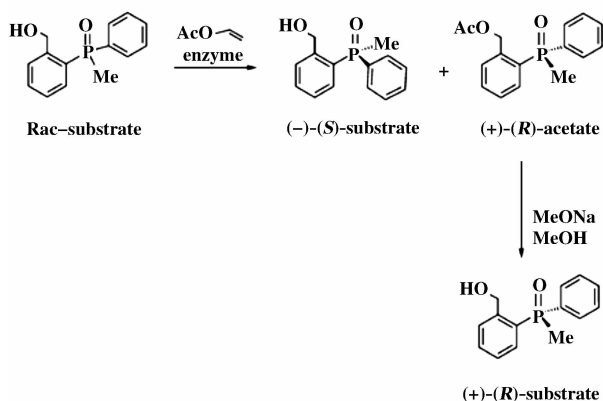


图 2 动力学拆分外消旋 2-羟基甲基苯基 (甲基) 苯基氧化膦

Fig.2 Kinetic resolution of 2-hydroxymethylphenyl (methyl) phenylphosphine oxide

的菌株赤霉菌 *Gibberella intermedia* WX12 将 3-(4-氯苯基)-戊二腈转化为 (S) 型 4-氰基-3-(4-氯苯基)-丁酸, 产率为 90%, 其对映异构体过量值 ee > 99%. Zhang 等^[17]利用来源于 *Alcaligenes sp.* ECU0401 的腈水解酶来水解扁桃腈, 高效的生产 (R)-(-)-扁桃酸, ee 值达到 99%. 另外蛋白酶在催化酰基水解也会表现出立体选择性, 如张媛媛等^[18]研究以盐为添加剂时, 盐的种类、酶的种类及底物结构对酶促外消旋对羟基苯甘氨酸酯不对称水解的影响, 发现添加碳酸氢铵可分别提高蛋白酶 Alcalase 催化该反应的反应初速度及 E 值 1.30 倍和 3 倍.

1.2 氧化-还原酶

氧化还原酶在生物体内大量存在, 是生命活动中能量代谢的核心酶, 在生物不对称合成与手性化合物制备中得到了广泛的应用, 其中羰基的不对称还原是生物催化中最活跃的领域之一. 对使用氧化-还原酶进行手性化学品生产的概况进行整理^[19-26], 见表 1 与图 3.

除羰基外分子中的其他不饱和键上也能发生不对称还原. Michael 等^[27]利用实验室已有的一系列胺脱氢酶 (苯丙氨酸脱氢酶与亮氨酸脱氢酶 LeuDH) 在体外催化来合成手性胺, 以对氟苯基丙酮为底物, 用 PheDH K77M 和 PheDH N276V 不对称转氨合成 (R)-1-(4-氟苯基)丙基-2-胺, ee 值 > 99.8%. 利用 PheDH K77S 与 PheDH N276L 以其它酮类 (直链脂肪酮, 环酮, 芳香酮) 为底物也达到不错的不对称转氨效果 (ee 值 > 85%), 实现了广泛的底物适应性, 与催化反应的高手性选择性和高转化率. 辛艳飞等^[28]研究大鼠体内的 D 型氨基酸氧化酶 (DAAO) 参与的 D 型氨

表 1 酶独自催化还原反应合成的一些精细化学品

Table 1 Some synthesis of fine chemicals by means of reductive processes catalyzed by isolated enzymes

Entry	Product	Biotacalys	Production parameters
1	(S)-1	Ketoreductase from <i>Candida parapsilosis</i>	10 kg/N. R. /ee _p > 98%
2	(S)-2	ADH from <i>R. erythropolis</i> /FDH from <i>C. boidinii</i>	Gram/72% yield/ee _p >99%
3	(R)-3	Recombinat Ketoreductase	80 kg/N. R. /ee _p >99%
4	(R)-4	Rec. ketoreductase from <i>Lactobacillus kefir</i>	100 kg/90% yield/ee _p >99%
5	(S)-5	ADH from <i>R. erythropolis</i>	25 kg/N. R. /ee _p >99%
6	(S)-6	Genetically modified ADHs	>200kg/90% yield/ee _p >99%
7	(S)-7	Rec. ketoreductases, glucose and GDH	232.61 g/99% yield/ee _p >99%
8	(S)-8	Engineered phenylalanine dehydrogenase	>100 kg/98% yield/ee _p >99%
9	(S)-9	Engineered KREDs from <i>Codexis</i>	Gram/99% yield/ee _p >99%

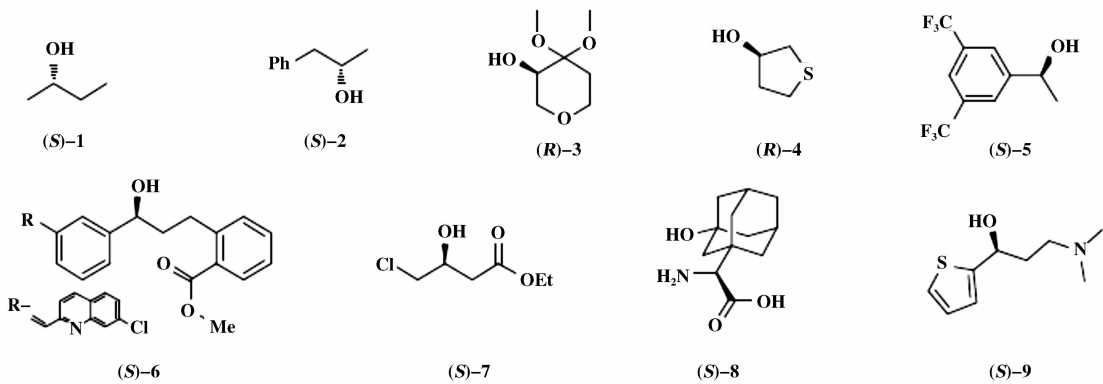


图 3 单一酶催化还原得到一些手性模块

Fig.3 Some chiral building blocks obtained through bioreductions catalyzed by isolated enzymes

基酸的手性转化，发现 DAAO 对 D-Phe 的专一性约为 D-NNA 的 15 倍，对 D-Leu 的专一性约为 D-NNA 的 7 倍，但是 D-Phe、D-Leu 和 D-NNA 在体内表现出相似的手性转化率。徐红梅等^[29]利用来自变异三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)的 D-氨基酸氧化酶进行固定化催化 DL-2-氨基丁酸、DL-2-氨基戊酸去消旋化，L-2-氨基丁酸、L-2-氨基戊酸的收率分别为 48% 和 47%，ee 值分别为 99.5% 和 99.8%。张晓斌^[30]利用来自假丝酵母(*Candida. maltosa*)的 L-丙氨酸氧化酶不对称催化氧化底物 DL-丙氨酸中的左旋异构体脱去氨基分解，从而制备 D-丙氨酸，转化率≥98.5%，光学纯度≥99%。由上可见 D 或 L 型专一性氨基酸氧化酶在不对称催化上还是具有一定应用，但从目前文献来看，氧化酶类单酶能应用到对映体选择性催化的成果任然较少，多需要引入一些辅助因

子与辅助酶^[31]。

1.3 转移酶

转移酶中转氨酶研究较多，其来源广，极易产生手性中心，合成药物的手性前体。Desiree Pressnitz 等^[32]利用 ω-转氨酶不对称胺化苯并二氢吡喃酮，得到手性中间体，最终转化苯并二氢吡喃胺类衍生物(图 4)。并且通过调节反应条件中的辅酶，氨供体，缓冲体系来构造不同的反应系统，还可以得到 1-和 2-四氢萘胺及其衍生物，以及 3-和 4-苯并二氢吡喃胺及相应的对映体(ee 值> 99%)。Schatzle 等^[33]选取七种转氨酶(AspTer, PenChr, AspOry, AspFum, NeoFis, GibZea, MycVan)构建以(R)-选择性转氨酶为中心的催化工具箱，通过利用不同转氨酶对不同底物的不对称催化。比如用转氨酶 AspTer 不对称催化 2-己酮转氨，得到(R)-2-己胺，转化率达到 99%

以上, ee 值大于 99%; 用转氨酶 AspFum 不对称催化 2-庚酮转氨, 得到 (*R*)-2-庚胺, 转化率达到 99% 以上, ee 值大于 99%; 用转氨酶 AspOry 不对称催化对甲氧基苯基 2-戊酮转氨, 得到 (*R*)-甲氧基苯基 2-戊胺, 转化率达到 99% 以上, ee 值大于 99% 等. 构建了一种高产物手性选择性, 底物适应广谱性的系统催化方法来专一性合成光学纯度较高的 *R* 型脂肪胺与芳香胺.

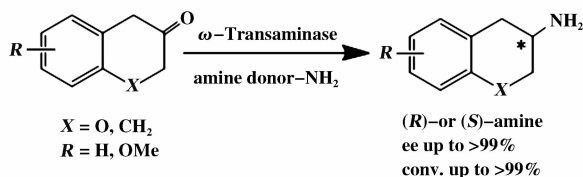


图 4 ω -转氨酶催化不对称胺化

Fig.4 Asymmetric amination with ω -Transaminase

1.4 其他种类酶

除了上述的 3 大类外, 也有相当的报导是关于裂合酶、异构酶用于生物催化不对称合成, 但是裂合反应与异构反应很多反应机理不是很清楚, 反应困难且副反应多, 生物酶库资源少等一系列因素阻碍了对其的研究, 但是最近仍有许多可喜的进展. 在裂合酶方面, 醇酐裂解酶很早就被利用催化醛酮与氢氰酸来生产氰醇^[34], 如利用来自苦扁桃果实部分的醇酐裂解酶催化苯甲醛与氢氰酸生成 *R* 型苯甲氰醇, 产率达到 95%, 光学纯度达到 99%; 催化对氯苯甲醛与氢氰酸生成 *R* 型对氯苯甲氰醇, 产率达到 94%, 光学纯度达到 97%. 最近 Matej 等^[35]使用 2-脱氧核糖-5-磷酸醛缩酶 (DERA) 首次利用单一 DERA 催化底物进行不对称羟醛缩合制备手性乳醇的中间体. 在异构酶方面, Zheng 等^[36]发现反应中加入乙酸的方法大大提高腈裂解酶形成 *S* 型氰醇的立体选择性, 对映体的纯度大于 90%, 光学纯度显著高于以前的报道的结果, 推测可能乙酸与腈裂解酶的活性中心存在相互作用. Lukas 等^[37]通过研究查耳酮异构酶不对称催化环化 2-羟基查耳酮的可逆反应 (图 5), 对反应机理进行分析, 构建了一个化学模型用于研究均衡可逆的不对称催化行为, 为指导同类型酶的不对称反应奠定基础.

随着研究的深入与为了研究范围的扩展, 除了以上相对常见的酶, 人们逐渐将目光投向抗体酶与核酶. 抗体具有高度特异性的结合作用, 抗体对底物的选择性比一般的酶高, 它能够区分结构上的细微

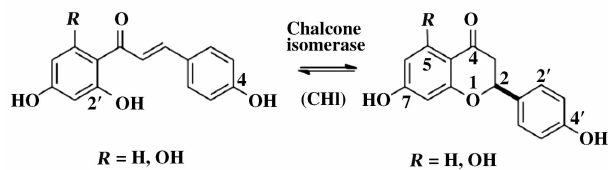


图 5 酶催化环化羟基查耳酮合成黄烷酮

Fig.5 Enzymatic cyclization of hydroxylated chalcones to flavanones

差异. 抗体酶是人工制造的酶类似物, 该技术也已应用于非水酶学的研究中. Janda 等^[38]用 1-苯乙磷酸酯作为半抗原与载体蛋白共价结合后免疫小鼠, 利用淋巴细胞杂交瘤技术培养出 11 个单克隆抗体, 其中 9 个抗体只能催化 (*R*)-1-苯乙磷酸酯水解, 另 2 个只能催化 (*S*)-1-苯乙磷酸酯水解, 提出了一种成熟的思路来将抗体酶运用于不对称催化. YANG 等^[39]利用四面体含磷和含硫半抗原作为半抗原, 并与牛血清蛋白 (BSA) 偶联制备成免疫源, 经免疫和克隆成功筛选出具有催化加速选择性水解生成 *S*-布洛芬的特异性催化抗体, 并在建立的共溶剂体系中进行不对称水解, 反应具有良好的对映选择性 (ee>99%) 与较高的转化率 (达到 41.7%). Xu 等^[40]在核黄素存在无氧环境下利用单克隆抗体 YX1-40H10 催化 (*R*)-2 甲基苯丙胺进行光氧化生成苯甲醛, 反应对映体专一性很高. 与抗体酶相比, 应用核酶进行不对称催化的报导很少, 但端粒酶^[41]与反义基因核酶^[42]确实是一些反应中表现出立体选择性, 随着研究的深入, 可能会成为酶不对称催化领域的一大补充.

2 多酶联用系统

多酶联用普遍存在于自然界中, 生物体中的物质代谢和自然界中生物的共生现象都是由各种各样的多酶体系所维系的. 它是一个高效而精确的系统, 高度协调地维持着一系列酶反应之间的平衡. 微生物体内多酶体系在催化过程中表现出高选择性、高效率 and 高度协调性, 为构建多酶反应体系、优化改造生物催化过程提供了借鉴^[43]. 随着对酶不对称催化研究的深入, 很多单酶系统的缺陷如辅酶再生等暴露出来, 为了解决这一问题, 人们尝试将多酶反应体系应用于催化不对称合成. 目前研究较多的是基于辅酶再生的多酶联用系统、基于底物连续转化的多酶联用系统与基于全细胞催化的多酶联用系统 3 大类.

2.1 基于辅酶再生的多酶联用系统

经过多年发展，水解酶与氧化还原酶由于反应简单、条件易控制、酶源广泛等优点，已成为手性生物催化的热点。而与水解酶相比，氧化还原酶如脱氢酶和氧化酶大多需要辅酶，若不考虑其再生而连续添加，会带来成本太高、影响反应进程、产物不易分离等问题，因此非常有必要进行辅酶再生。Xue

等^[44]根据是否涉及辅因子将多酶联用系统分为辅因子循环与平衡移动两大类：辅因子循环系统较小，双酶与三酶联用系统较为常见，核心酶都分布辅因子循环通路上；平衡移动系统大小不定，体系内不以没有单独催化活性的辅因子为中心，体系多为链状，多用于研究代谢通路。

多酶联用系统(表2)经过近30年的发展,目前

表 2 多酶联用体系应用
Table 2 Applications of multi-enzymatic process

Type	Enzymes involved	
Co-factor regeneration	$\text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{NAD(P)H}$	Formate dehydrogenase
		Glucose dehydrogenase
		Alcohol dehydrogenase
		Glutamate dehydrogenase
	$\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{NAD(P)}^+$	NADH oxidase
		Pyruvate kinase
Shift equilibrium	$\text{NDP} \rightarrow \text{NTP} (\text{N} = \text{A, C, U})$	Polyphosphate kinase
		Creatine phosphokinase
	$\text{NMP} \rightarrow \text{NDP} (\text{N} = \text{A, C})$	Nucleoside monophosphate kinase
	Removal of intermediate	Acylglucosamine 2-epimerase and acid aldolase
	Removal of byproduct	Lactate dehydrogenase

运用于酶辅因子再生路径的技术相对成熟，主要有两大类：对于氧化还原酶中涉及还原氢传递的 $\text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{NAD(P)H}$ ^[45-47] 与 $\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{NAD(P)}^+$ ^[48-49] 途径；对于涉及磷传递的 $\text{NDP} \rightarrow \text{NTP} (\text{N} = \text{A, C, U})$ ^[50-52] 与 $\text{NMP} \rightarrow \text{NDP} (\text{N} = \text{A, C})$ ^[53] 途径。目前研究较多的还是传递还原氢的辅酶再生系统，其中羰基还原酶/醇脱氢酶系统、氨基酸氧化酶/转氨酶系统、氨基酸氧化酶/氨基酸脱氢酶系统是热点，最近报导很多。Mangan 等^[54]构建了一个三酶系统，即葡萄糖脱氢酶(GDH)、羰基还原酶(CRED)、烯基还原酶(ERED 的辅酶循环体系(图 6)，应用该法可以顺利实现 CRED 与 ERED 双酶协同作用下的辅因子循环。杨晟等^[55]以 L-苏氨酸为原料，通过由苏氨酸脱氨酶、L-氨基酸脱氢酶和辅酶再生系统构成的酶催化体系催化生产 L-2-氨基丁酸，转化率达到 90% 以上。Park 等^[56]利用苏氨酸脱氨酶与 ω -转氨酶联用选择性催化 L-苏氨酸转化为 L-高丙氨酸，同时拆分 1-苯乙胺，得到(R)-1-苯乙胺，ee 值达到 99%。

Xin 等^[57]在研究大鼠体内的 D 型氨基酸氧化酶(DAAO)参与 NG-硝基-D-精氨酸单向手性转化的机制中发现转氨酶也有参与。

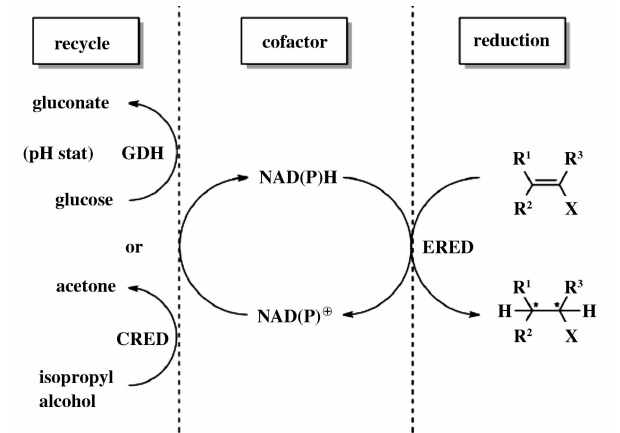


图 6 ERED 不对称合成下 NAD(P)H 的循环系统
Fig. 6 Recycle systems for NAD(P)H in ERED
synthetic applications

关于平衡移动酶控制方向也有学者做出了开拓式研究^[58-59], 在 N-乙酰神经氨酸合成与氨基酸转氨路径上, 初步实现利用对酶的调节, 实现反应路径的定向调控, 但由于反应复杂, 涉及酶多, 条件难以控制等原因依旧难以运用。

2.2 基于底物连续转化的多酶联用系统

虽然单纯酶系统应用于手性化合物合成的成功例子不少, 但是当遇到难于直接引入手性中心或需要引入多个不同位点的手性中心等问题时, 单酶催化往往无法达到预期。为了解决这一困难, 有人提出非同工酶链式反应的方法, 利用多种不同种类酶的协同作用来构建基于底物连续转化的多酶联用系统。

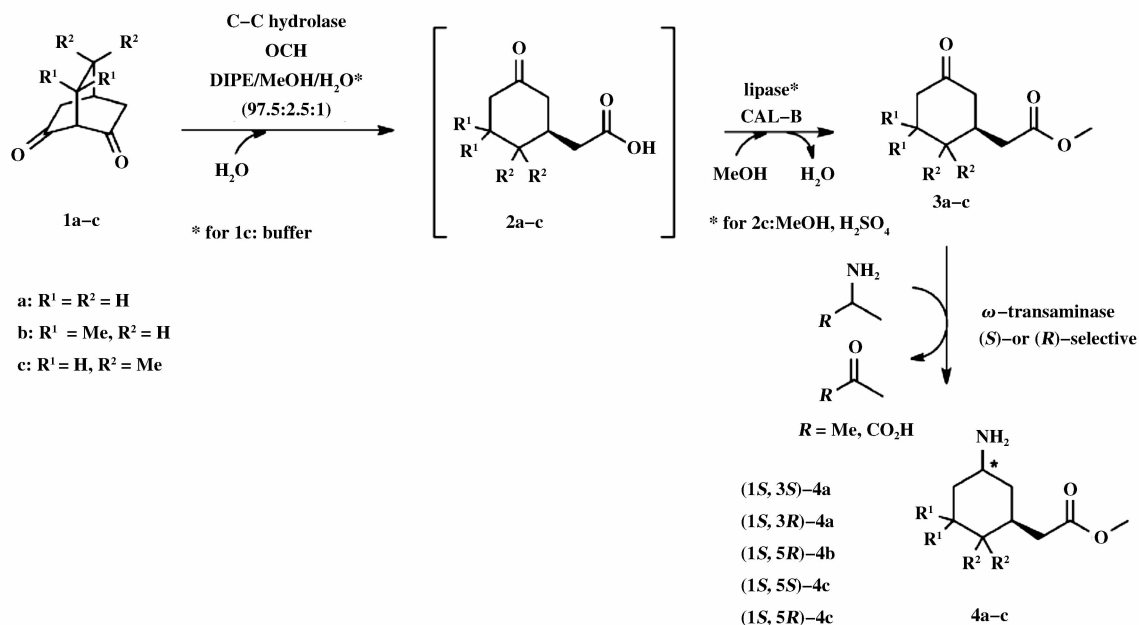


图 7 三酶顺序催化合成 2-(3-氨基环己基)乙酸甲基酯衍生物

Fig. 7 Three-enzyme sequence for the synthesis of 2-(3-aminocyclohexyl)acetic acid methyl ester derivatives

2.3 基于全细胞催化的多酶联用系统

全细胞催化是指利用完整的生物有机体(即全细胞、组织甚至个体)作为催化剂进行化学转化, 其本质是利用细胞内的酶进行催化。细胞内完整的多酶体系可以实现酶的级联反应, 从而弥补酶法催化中级联催化过程不易实现的不足, 提高了催化效率; 细胞内富含大量天然辅因子与其循环途径, 降低了建立辅酶再生体系的难度; 可以结合基因工程重组表达多种工程酶, 理性可控的设计反应体系, 又省去了繁琐的酶纯化过程, 产物制备更加简单, 生产成本更低。由于以上优点, 基于全细胞的多酶联

用系统来进行不对称催化这方面的研究越来越多, 成果丰硕。

Siirola 等^[60]联用 6-氧化樟脑水解酶、南极假丝酵母脂肪酶 B (CAL-B) 和 ω-转氨酶, 通过 3 个连续酶催化步骤分步协同制备手性 3-取代环己胺衍生物, 实现了直接在有机溶剂中进行生物胺化(图 7)。由于目前能应用于不对称催化的酶主要集中在水解酶、氧化还原酶与转移酶, 脂肪酶、脱氢酶、醛酮还原酶与转氨酶的研究较多, 相关的研究理论与工程运用资源丰富, 利用现有酶资源间接实现工业生产实际需求成为一种简便途径。底物连续转化的酶联用系统可以将几种高效工程酶有机结合起来, 实现高效高选择性的不对称合成, 在氧化-还原、水解-酯化、氧化-转氨等联合反应中有广阔的应用前景。

用系统来进行不对称催化这方面的研究越来越多, 成果丰硕。

有直接利用菌株进行全细胞催化不对称反应, 如 Fragnelli 等^[61]利用毕赤葡萄糖酵母在水有机两相体系中催化 1, 2-二苯基乙二酮还原和去消旋化, 最终得到 (S)-(+)-安息香, ee 值达到 95%; Suyog 等^[62]利用近平滑念珠菌在己烷中实现 (S)-1-(1-萘基)乙醇到 (R)-1-(1-萘基)乙醇的手性反转, 转化率达到 88%, ee_R 值达到 100%; Mu 等^[63]利用近平滑念珠菌全细胞, 依靠菌内的具有对映体选择性的脱氢酶与羰基还原酶两步反应催化苯基-1, 2-乙二

醇去消旋化, 制备 (*S*)-1-苯基-1, 2-乙二醇, ee 值达到 91.6%, 产率达到 82.5%。也有利用工程菌重组表达其他菌株特定具有对映体选择性的酶, 进而进行全细胞催化, 如 Urano 等^[64] 利用大肠杆菌 JM109 重组表达红平红球菌 MAK154 的氨基醇脱氢酶再结合自身的葡萄糖脱氢酶, 全细胞催化立体选择性还原 (*S*)-1-苯基-1-酮基-2-甲氨基丙烷得到 *d*-伪麻黄碱 (DPE), 产率达到 89.1%, ee 值大于

99%, 反应过程如图 8; Zhang 等^[65] 利用大肠杆菌重组表达近平滑念珠菌 CCTCC M203011 的 (*R*)-羧基还原酶 (RCR) 与 (*S*)-羧基还原酶 (SCR) 再联合自身的吡啶核苷酸转氨酶 (PNTS), 全细胞催化 1-苯基-1, 2-乙二醇 PED 的对映体收敛, 产物 (*S*)-PED 的 ee 值达到 97.4%, 反应 6 h 产率达到 95.2%, 反应具体见图 9。

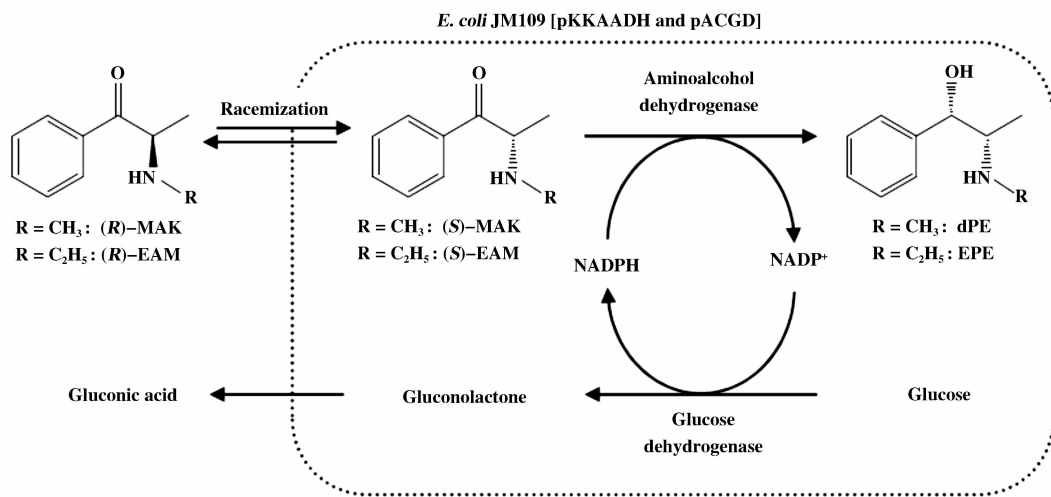


图 8 利用重组大肠杆菌细胞中的 NADPH 再生系统不对称还原外消旋底物得到手性产物

Fig. 8 Asymmetric reduction of the racemic substrate to a chiral product, and the NADPH regeneration system using recombinant *E. coli* cells

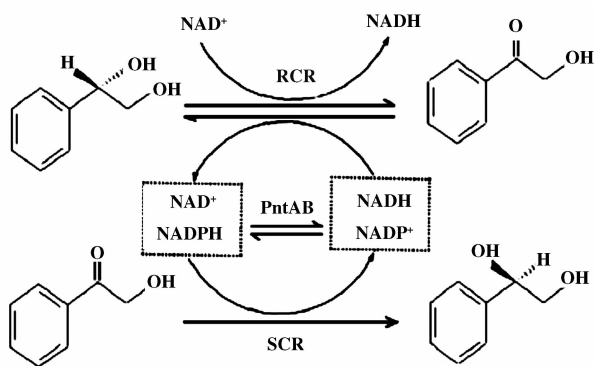


图 9 利用重组大肠杆菌细胞中的辅酶再生系统对外消旋底物进行对映体收敛得到手性产物

Fig. 9 Enantioconvergence of the racemic substrate to a chiral product, and the Coenzyme regeneration system using recombinant *E. coli* cells

3 化学法/酶法集成系统

自 19 世纪 Fischer 开创不对称合成反应研究领

域以来, 不对称催化的研究在 20 世纪 60 年代因不对称催化氧化与还原取得突破后, 发展至今经历手性源的不对称反应、手性助剂的不对称反应、手性试剂的不对称反应、不对称催化反应 4 个阶段^[66]。化学法/酶法集成系统融合两类方法的优势, 可以通过调用有机催化剂, 金属配合物或酶来实现去消旋化与动态动力学拆分系统, 运用于生物制造手性化学品领域^[67], 目前运用这一系统报道较多的有动态动力学拆分、去消旋化与人工金属酶。

3.1 基于动态动力学拆分的化学法/酶法集成系统

对映体拆分可以利用水解酶实现, 但动力学拆分的最大理论转化率只有 50%, 从而造成极大的浪费。所以通常需要在动力学拆分的基础上, 对非目标对映体进行消旋处理后再次进行拆分, 经过多轮拆分—消旋—拆分循环后, 理论转化率可达 100%, 这种改进的动力学拆分即是动态动力学拆分 (DKR)。DKR 是将非目标对映体的外消旋化过程和目标对映体的拆分过程同时进行, 底物的一种对

映体连续外消旋化, 最终实现构型翻转(图 10)^[68].

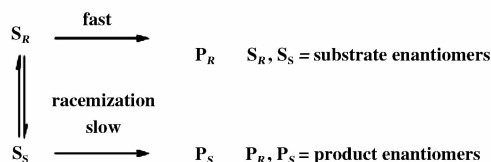


图 10 动态动力学拆分
Fig. 10 Dynamic kinetic resolution

由于消旋酶种类极少、酶源非常有限, 所以非目标对映体的外消旋化过程很难用酶催化法来实现, 但运用某些金属离子催化底物化学消旋的技术却相对成熟, 甚至有些酶与金属离子还可发生一些有益互作。离子液体可以帮助底物外消旋, Mantarosie 等^[69]报道了利用洋葱假单胞菌脂肪酶(PS)在活性炭纸 KynolTM/[Emim][BF₄]中以苯磺酰胺与顺丁烯二酸酐为底物, 进行不对称酯化, 产物马来酸酐酰化苯磺酰胺立体选择性非常好(*E*>200)。而过渡金属催化剂 Williams 课题组^[70]首先报道了酶和过渡金属联用于仲醇 DKR, 通过应用铝、铈、铈的配合物在均相中催化(*S*)-1-苯乙醇的外消旋化, 发现[*Ir*(coe)Cl]₂、Al(OiPr)₃、Rh₂(OAc)₄等金属催化剂都具有良好的消旋特性, 与荧光假单胞菌脂肪酶(PFL)配伍进行 DKR 时, 苯乙醇转化率为 60%, (*R*)-乙酸苯乙酯的 *ee* 值达 98%。Hoyos^[71]等在进行水解酶与金属联用的动态动力学拆分(DKR)在选择性催化合成手性脂肪醇与芳香醇, 发现了几个钌金属配合物与脂肪酶的兼容性良好, 其中利用南极假丝酵母脂肪酶 CALB 与钌催化剂[*p*-Cl-C₆H₄-OAcRu(η^5 -C₅Ph₄OH)]动态动力学拆分 1-苯基乙醇, 制取 *R* 型苯乙醇, 转化率达到 88%, *ee* 值大于 99%。Bäckvall 课题组^[72]利用南极假丝酵母脂肪酶 B 和钌催化剂[RuCl(CO)₂(η^5 -C₅Ph₅)]联用进行动态动力学拆分, 得到各种烯丙基醋酸酯对映体, 并此为中间体合成纯手性的 5, 6-二氢吡喃-2-酮和 δ -内酯。

由于均相催化剂在产物分离和重复使用方面存在严重不足, 而多相外消旋催化剂可以克服以上缺陷, 从而提高催化剂的利用效率。Kim^[73]等利用多相催化高聚[Ph₄(η^4 -C₄CO)]Ru(CO)₃和 Novozym 435 联用, 对苯乙醇进行 DKR, 以乙酸异丙酯为辅底物在甲苯溶剂中反应 20h, (*R*)-乙酸苯乙酯的收率为 99%, *ee* 值大于 99%, 具体反应进程见图

11。戴晓庭等^[74]以十二烷基磺酸根离子改性的层状双氢氧化物(LDH)为载体负载金属钯制备了新型消旋催化剂 Pd/LDH-DS, 在甲苯内利用它与脂肪酶 Novozym 435 以戊酸对氯苯酯为酰基供体, 首次采用动态动力学方法成功制备光学纯(*R*)-1-氨基茛满, 最终产物(*R*)-1-氨基茛满戊酸酯, 产物收率>99%, 产物光学纯度 *e. e.* _p>99%。同一课题组 Xu 等^[75]利用 Pd/LDH-DS 与脂肪酶 Novozym 435 进行芳香胺的动态动力学拆分, *R* 型 1-苯乙胺衍生物普遍具有良好的转化率(95% 以上)和高光学纯度(*ee* 值 93% 以上), 且该系统可以重复使用 30 次以上, *ee*_p 没有明显下降。

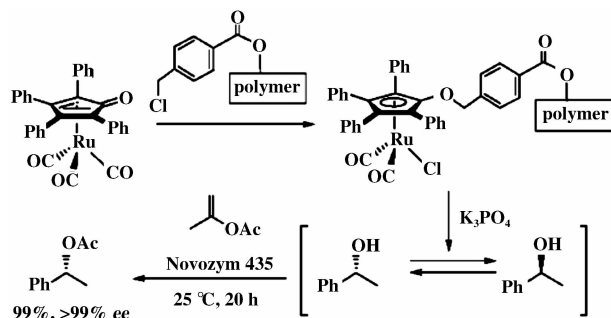


图 11 联用[Ph₄(η^4 -C₄CO)]Ru(CO)₃和
Novozym 435 动态动力学拆分苯乙醇

Fig. 11 Dynamic kinetic resolution of phenylethanol with
[Ph₄(η^4 -C₄CO)]Ru(CO)₃ and Novozym 435

此外还可通过数学建模与计算机模拟设计构建 DKR 体系, 从而对反应过程进行优化。如 Lau Sie Yon^[76]等利用工程学思想, 对反应体系进行热力学与物料衡算, 设计工艺参数如酶负荷、消旋催化剂量、反应温度、缓冲液的 pH 值以及流率, 利用实验室自己筛选得到构建脂肪酶与诺维信 435 等构建催化的动态动力学拆分过程模型。利用布洛芬酸为底物进行不对称酯化, 最终得到(*S*)-布洛芬酸, 转化率可达 96%~98%, *ee* 值可达 97%~99% 并且实验数据与理论吻合良好。

3.2 基于去消旋化的化学法/酶法集成系统

去消旋化过程, 又称为对映体收敛转化法, 有别于分离两种对映体, 是将两种对映体通过独立的路线转化为相同的立体异构体产物, 其中一种对映体的构型保持不变, 而另一种发生改变^[77]。

Wang 等^[78]利用脂肪酶 Novozym435 与环化剂 50% 的 H₃PO₄, 催化 4-[(4-二甲基氨基)-1-(4-氟苯基)-1-羟基-1-丁基]-3-(羟甲基)-苄腈去消旋化合

成 *S*-西酞普兰, ee 值大于 91%. Pronin 等^[79]以三甲基氧硅烷为核心设计了一种能完成以叔醇合成叔烷基异腈或胺催化过程的手性反转, 弥补了酶在叔醇的不对称生物转化方面的空洞, 联合氧化酶、水解酶去消旋化运用前景广阔. Dunsmore 等^[80]利用来自 *Aspergillus niger* 的单胺氧化酶 (MAO-N) 和一种无选择性的化学还原试剂 (氨水-硼烷) 来建立一种实用的去消旋过程制备手性胺方法. 酶只氧化 *S* 型对映体为亚胺, 后者可以被化学试剂还原为外消旋胺. 这样重复操作, 最终可以获得 *R* 型对映体, 产率达到 75% 和对映体过剩值达到 99%, 反应如图 12 所示. 相对动态动力学拆分通过重金属催化剂与酶来实现, 去消旋化过程一般是一个氧化还原过程, 如仲醇对映体之间的相互转化可以通过形成酮类中间体来实现而氨基酸或胺类对映体之间的转化可以通过形成亚胺来实现, 靠化学法难以实现, 在化学法/酶法集成系统中运用不如 DKR.

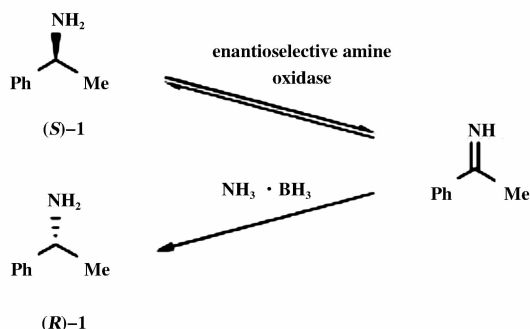


图 12 光学选择性的胺环氧化酶和化学还原试剂氨水-硼烷进行 α -甲基苯胺的去消旋化

Fig. 12 Deracemization of α -methylbenzylamine with an enantioselective amine oxidase in combination with ammonia borane as the reducing agent

3.3 基于人工金属酶的化学法/酶法集成系统

随着对酶的作用机理的研究的深入, 在分子水平上模拟酶活性部位的形状、大小及其微环境等结构特征, 在功能上模拟酶的催化活性和立体选择性等成为可能. 目前将生物活性分子与金属离子结合起来的人工金属酶方面的研究已成为生物催化领域热点之一.

现在利用手性配体或化学修饰有机物作为催化剂进行不对称催化的研究很多^[81-82], 人们逐渐将目光投向关键功能分子. 在小分子金属酶中, 将氨基酸与重金属催化剂结合起来研究较多, 杨朝芬等^[83]在温和条件下制备了 L-脯氨酸稳定并修饰的

负载型金属铑催化剂, 催化苯乙酮不对称加氢反应获得 92.1% 的转化率和 ee 值达到 32.9%. 在大分子金属酶领域, 以核酸与多肽为基底较为常见, Deuss 等^[84]整理了目前常见的以 DNA 和多肽为基底的人工金属酶 (图 13 与图 14), 用于不对称

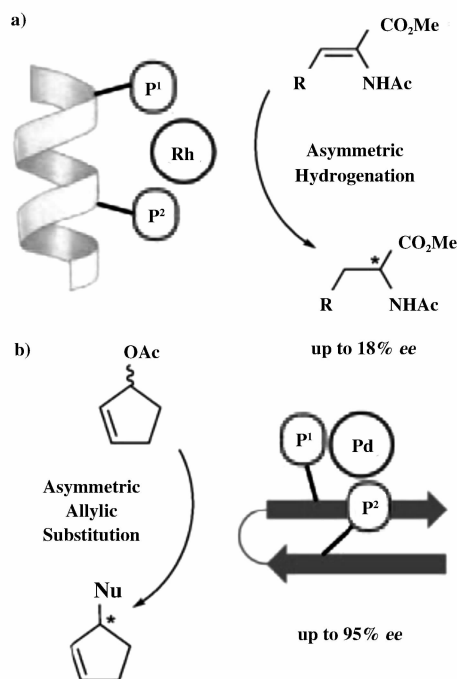


图 13 基于螺旋聚合物人工金属酶 a) 铑 b) 钯

Fig. 13 Artificial metalloenzymes based on helical polymers with a) Rh b) Pd

催化. 螺旋聚合物人工金属钯酶催化 3-乙氧基-1-环戊烯的不对称取代合成单一 *S* 与 *R* 型 3-烯丙基-1-环戊烯, ee 值达到 95%. 多肽模板人工金属铑酶以 2-N-乙基-1-丙烯酸甲酯为底物进行不对称氢化催化, 可以合成单一 *S* 与 *R* 型 2-N-乙基-1-丙酸甲酯, ee 值达到 95%. 实现了不对称取代与不需辅酶的不对称还原, 展示了生物酶目前难以实现的催化性能, 具有很大发展前途. 在人工金属酶的设计上也有不少突破, Dydio 等^[85]研究烯炔氢甲酰化反应中远程超分子控制催化剂选择性, 提出了一种新仿生酶的设计思路. 他们利用分子间作用力固定游离分子, 以环醚类结构作为亲和中心, 两者共同组成具有催化选择性的人工酶. 利用 7, 7'-二氨基-2, 2'-二吡啶甲烷、磷酸根阴离子、三苯基膦基团组成亲和和环状配体 DIMPhos, 然后结合游离分子组成人工酶 [Rh (DIMPhos · AcO) (CO) Cl]⁻ (图 15), 催化 1-戊烯酸进行不对称加成, 生成 1-醛己酸 (1) 与 1-醛-

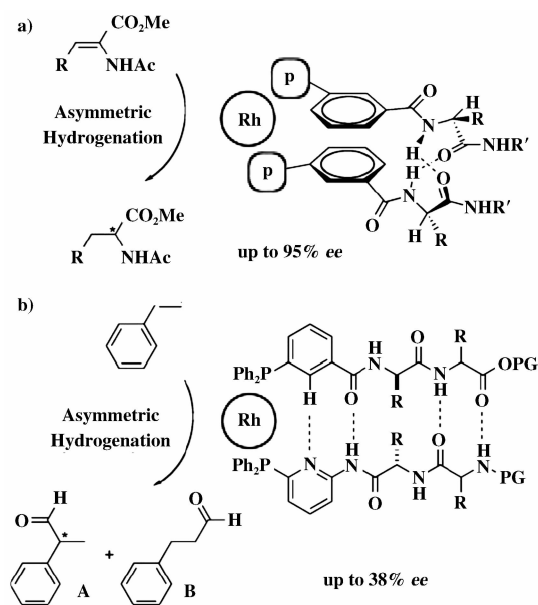


图 14 基于多肽人工金属酶 a) 合铑催化的不对称氢化反应 b) 合铑催化的不对称氢甲酰化

Fig. 14 Artificial metalloenzymes based on peptides with

a) rhodium-catalysed asymmetric hydrogenation

b) rhodium-catalysed asymmetric hydroformylation

2-甲基戊酸(b), 反应转化率最高达到 100%, $E(1/b) > 50$. 由于催化剂结构简单, 分子力学与能量变化用泛函 DFT 能轻松计算, 通过理性设计可以运用于不同底物, 控制产物的不同构象, 应用价值巨大.

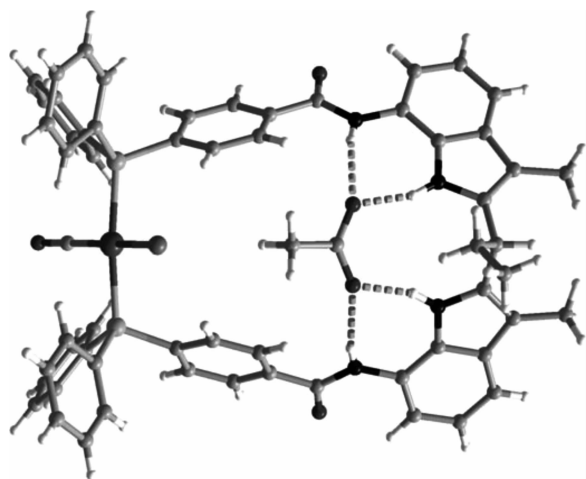


图 15 超分子复合物的晶体结构

Fig. 15 Crystal structure of the supramolecular complex

4 展 望

酶催化是生物催化中核心部分, 相比化学合成

具有反应条件温和、选择性强、环境友好等优点, 利用清洁绿色的生物催化合成代替传统的高污染高能耗的化学合成成为各国科学家与政府机构的共识, 具有广阔的发展前景. 目前在 3 大酶促不对称合成系统中, 单酶催化系统研究较多的主要是水解酶和氧化还原酶, 转移酶中的转氨酶最近也成为热点, 但这远远不能满足在化工生产中需求, 大部分不对称取代与环状化合物构象翻转等常见的有机反应目前无法利用单酶催化实现, 随着人们研究的深入与生物技术的发展, 将来可以通过筛选更多的酶来满足各类不对称反应或是利用融合蛋白技术构建目标工程酶来解决困难. 为弥补单酶催化系统的不足而发展起来的多酶联用系统可实现很多复杂的不对称反应, 特别是氧化还原反应与多步反应, 可以克服单酶催化系统需要添加循环辅助酶与辅助底物, 存在生产产本高、反应不易控制、底物不易分离与操作繁琐等问题, 但也应看到现阶段多酶联用系统中研究的酶类型较少, 运用的反应类型单一, 无法满足化工生产中各类不对称反应需求, 获取各类反应合适的工程酶与构建更优良的反应体系成为解决问题的关键. 化学法/酶法集成系统则可结合现今研究比较成熟的化学催化剂与生物酶两者长处, 是对前面两类系统的重要补充, 应用范围广, 工业化运用较为容易, 但因为联合系统反应条件不易控制, 反应机理不易得出, 系统理性设计困难等问题, 仅仅在动态动力学拆分、去消旋化与人工金属酶领域有较多运用, 在其他领域解决实际工业生产问题无有效手段. 目前利用计算机模拟 QM 算法已经能解决 1 000 个原子左右的模拟计算, 能满足大部分化学酶与辅助因子的功能模拟需求, 但对酶活性中心与底物结合区域的精确模拟仍然困难, 将来有望对酶结构功能进行准确解析进而提出一套行之有效的模拟方案来理性设计化学法/酶法集成系统.

随着生物技术、特别是基因工程和酶工程技术的发展和进步, 有望在不久的将来获得更多种类工程酶, 这些工程酶的催化活性、立体选择性、耐受性将会得到明显提升; 依靠更优良的分子力学模型与更成熟的计算机模拟技术, 酶促不对称合成系统的设计更加理性化与标准化; 随着生物酶学、介质体系、反应能量控制等方面理论取得突破, 将会让我们对酶反应的机理与反应系统变化认识更加深刻, 从而指导我们设计更好的不对称合成系统. 这

些将为我们根据工业生产需要合理设计酶促不对称催化手性合成系统打下更加坚实的基础, 从而实现反应过程绿色化与社会发展可持续化, 最终产生巨大的经济效益和生态效益。

参考文献:

- [1] Zhang Xiaoli (张小里), Zhao Binxia (赵彬侠). Chiral synthesis with biocatalyst[J]. *Mod Chem Ind* (现代化工), 1997, **7**: 42-43.
- [2] a. Tong Hai-bao (童海宝). Applications of biocatalysis in fine chemical[J]. *Fine Spec Chem* (精细与专用化学品), 2002, **10**: 9-10.
b. Song Hao, Zhang Ying-xin, Xin Jiao-ying, Xia Chungu. Study on molecular weight of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesized by *Methylosinus trichosporium* IMV3011[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2012, **26**(1): 70-79.
c. Yan Shao-xuan, Wang He-yuan, Jin Song, Li Nai-xuan. Preparation of magnetic nanocomposite microsphere-supported hemin mimetic enzyme catalyst and its application in the degradation of DMP[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2012, **26**(6): 560-565.
- [3] a. Wu Jian-ping (吴坚平), Yang Li-rong (杨立荣). Current situation and development trend of bio-manufacturing of chiral chemicals[J]. *Chin J Biopro Engin* (生物加工过程), 2013, **11**(2): 37-43.
b. Wang Meng-liang, Jiang Biao-lin, Cui Jin-long, Jiao Hong-wei. Effect of surfactants on the β -glycosidase enzymatic synthesis of salialroside in aqueous-organic biphasic systems[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2013, **27**(1): 83-88.
c. Zhang Tie-nan, Xin Jia-ying, Zhang Xiu-feng, *et al.* Methanobactin-catalyzed synthesis of gold nanopartecles[J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2013, **27**(2): 192-198.
- [4] Rachwalski M, Vermue N, Rutjes F P J T. Recent advances in enzymatic and chemical deracemisation of racemic compounds[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(24): 9268-9282.
- [5] Hélène Pellissier. Organocatalyzed dynamic kinetic resolution[J]. *Adv Synth Catal*, 2011, **353**: 659-676.
- [6] Alécia Vandenberghe, István E Markó. Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables[J]. *Indus Cro Prod*, 2013, **42**: 380-385.
- [7] Wei Xiao-fei, Zheng Qing-chuan, Ji Teng-fei, *et al.* Addition of diethylzinc to aromatic aldehydes catalyzed by hydrolase[J]. *Chin J Catal* (催化学报), 2009, **30**(5): 396-400.
- [8] Rui Tian, Chun-Hua Yang, Xiao-Fei Wei, *et al.* Optimization of APE1547-catalyzed enantioselective transesterification of (R/S)-2-methyl-1-butanol in an Ionic liquid[J]. *Biotechnol Biopro Engin*, 2011, **16**: 337-342.
- [9] Hou Xue-dan, Zhang Yi, Liu Huan, *et al.* Enzymatic synthesis of 5'-palmitate of 5-fluorouridine[J]. *Chin J Catal* (催化学报), 2011, **32**(11): 1733-1738.
- [10] Bala N, Chimni S S, Saini H S. *Bacillus alcalophilus* MTCC10234 catalyzed enantioselective kinetic resolution of aryl glycidyl ethers[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2010, **63**: 128-134.
- [11] Sheng Y, Wei C, Zhang Z. Enantioselective hydrolysis of glycidyl methylphenyl ethers by *botryosphaeria dothidea* ZJUZQ007: effect of substitution pattern on enantioselectivity[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, **164**: 125-132.
- [12] Michael Kotik, Alain Archelas, Veronika Faměrová, *et al.* Laboratory evolution of an epoxide hydrolase-towards an enantioconvergent biocatalyst [J]. *J Biotechnol*, 2011, **156**: 1-10.
- [13] Michael Kotik, Wei Zhao, Gilles Iacazio, *et al.* Directed evolution of metagenome-derived epoxide hydrolase for improved enantioselectivity and enantioconvergence[J]. *J Mol Catal B; Enzym*, 2013, **91**: 44-51.
- [14] Irimescu R, Saito T, Kato K. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system[J]. *J Mol Catal B; Enzym*, 2004, **27**(2/3): 69-73.
- [15] Sylwia Kaczmarczyk, Malgorzata Kwiatkowska. Enzymatic synthesis of enantiopure precursors of chiral bidentate and tridentate phosphorus catalysts[J]. *Adv Synth Catal*, 2011, **353**: 2446-2454.
- [16] Xu Mei-zheng (徐美珍), Ren Jie (任杰), Gong Jin-song (龚劲松), *et al.* Biocatalytic desymmetric hydrolysis of 3-(4-chlorophenyl)-glutaronitrile to the key precursor of optically pure baclofen[J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2013, **29**(1): 31-40.
- [17] Zhi-Jun Zhang, Jian-He Xu, Yu-Cai He, *et al.* Efficient production of (R)-(-)-mandelic acid with highly substrate/product tolerant and enantioselective recombinant *Alcaligenes sp.* nitrilase[J]. *Proc Biochem*, 2010, **45**: 887-891.
- [18] Zhang Yuan-yuan (张媛媛), Fan Xiao-dan (范晓丹), Zong Min-hua (宗敏华), *et al.* Effect of salt additives on enzymatic enantioselective hydrolysis of racemic p-

- hydroxyphenylglycine esters[J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2012, **28**(8): 898-902.
- [19] D Muñoz Solano, Hoyos P, Hernúiz M J. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs[J]. *Biores Technol*, 2012, **115**: 196-207.
- [20] Kosjek B, Nti-Gyabaah J, Telari K, *et al.* Preparative asymmetric synthesis of 4, 4-dimethoxytetrahydro-2-H-pyran-3-ol with a ketone reductase and in situ cofactor recycling using glucose dehydrogenase[J]. *Org Pro Res Dev*, 2008, **12**(4): 584-588.
- [21] Gupta A, Tschentscher A, Bobkova M. 2-Butanol production method: DE[P], 7371903. 2008-05-13.
- [22] Liang J, Mundorff E, Voladri R, *et al.* Highly enantioselective reduction of a small heterocyclic ketone: biocatalytic reduction of tetrahydrothiophene-3-one to the corresponding (R)-Alcohol[J]. *Org Proce Res Dev*, 2010, **14**(1): 188-192.
- [23] Pollard D J, Woodley J M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now[J]. *Trends Biotechnol*, 2007, **25**(2): 66-73.
- [24] Savage S A, Jones G S, Kolotuchin S, *et al.* Preparation of saxagliptin, a novel DPP-IV inhibitor[J]. *Org Process Res Dev*, 2009, **13**(6): 1169-1176.
- [25] Savile C, Gruber J M, Mundorff E, *et al.* Ketoreductase polypeptides for the production of a 3-aryl-3-hydroxypropanamine from a 3-aryl-3-ketopropanamine. US[P], 025238. 2010-6-17.
- [26] Ma S K, Gruber J, Davis C, *et al.* A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate[J]. *Green Chem*, 2010, **12**: 81-86.
- [27] Michael J Abrahamson, John W Wong. The evolution of an amine dehydrogenase biocatalyst for the asymmetric production of chiral amines[J]. *Adv Synth Catal*, 2013, **355**: 1780-1786.
- [28] XIN Yan-fei (辛艳飞), ZHOU Xiang-jun (周向军), WANG Yong-xiang (王永祥). Effects of D-amino acid oxidase on chiral inversion of N^G-nitro-D-arginine[J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2006, **33**(2): 135-139.
- [29] Xu Hong-mei (徐红梅), Xia Shi-wen (夏仕文), He Cong-lin (何从林). Preparation of non-natural l amino acids via deracemization of DL-amino acids catalyzed by immobilized D-amino acid oxidase[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2012, **26**(2): 192-196.
- [30] Zhang Xiao-bin (张晓斌). Enzyme asymmetric oxidation legal prepare D-alanine[J]. *Grain Sci Technol Eco* (粮
- 食科技与经济), 2011, **36**(4): 37-39.
- [31] Hibi M, Kawashima T, Yajima H, *et al.* Enzymatic synthesis of chiral amino acid sulfoxides by Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase[J]. *Tetrah: Asy*, 2013, **24**: 990-994.
- [32] Desiree Pressnitz, Christine S Fuchs. Asymmetric amination of tetralone and chromanone derivatives employing ω -transaminases[J]. *ACS Catal*, 2013, **3**: 555-559.
- [33] Sebastian Schatzle, Fabian Steffen-Munsberg. Enzymatic asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic, aromatic and arylaliphatic amines with (R)-selective amine transaminases[J]. *Adv Synth Catal*, 2011, **353**: 2439-2445.
- [34] Yu Yue-lin (余岳林). Synthesis of chiral cyanohydrins with Hnls[J]. *Wor Pest*, 2001, **23**(1): 29-31.
- [35] Matej Os^oljaj, Je'ro^ome Cluzeau. A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis[J]. *PLOS ONE*, 2013, **8**(5): e62250.
- [36] Zubiao Zheng, Yan Zi. A simple separation method for (S)-hydroxynitrile lyase from cassava and its application in asymmetric cyanohydration[J]. *Tetra: Asy*, 2013, **24**: 434-439.
- [37] Lukas Hintermann, Claudia Dittmer. Asymmetric ion-pairing catalysis of the reversible cyclization of 2'-hydroxychalcone to flavanone: asymmetric catalysis of an equilibrating reaction[J]. *Eur J Org Chem*, 2012, **28**: 5573-5584.
- [38] Janda K D, Benkovic S J, Lerner R A. Catalytic antibodies with lipase activity and R and S substrate selectivity[J], *Sci*, 1989, **244**: 437.
- [39] Yang Gen-sheng, Qi Ying-dan, Ou Zhi-min, *et al.* Enzymological characteristics of catalytic antibody-catalyzed enantioselective hydrolysis of ibuprofen ester in water-in-oil microemulsion[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 182-189.
- [40] Yang Xu, Mark S H, Noboru Yamamoto, *et al.* Antibody-catalyzed anaerobic destruction of methamphetamine[J]. *PANS*, 2007, **104**(10): 3681-3686.
- [41] Wang Chang-hao, Li Ying-hao, Jia Guo-qing, *et al.* Enantioselective friedel-crafts reactions in water catalyzed by a human telomeric G-quadruplex DNA metalloenzyme[J]. *Chem Commun*, 2012, **48**: 6232-6234.
- [42] Magdalena Wrońska, Jan Wrzesinski, Małgorzata Jezowska-Bojczuk, *et al.* The impact of isomers of hemiaminal-1, 2, 4-triazole conjugates differently substituted in the phenyl ring and their Cu²⁺ complexes on the catalytic

- activity of the antigenomic delta ribozyme [J]. *J Inorg Biochem*, 2012, **108**: 62–68.
- [43] Xie Xue-yuan(谢雪原), Zhou Hua(周华), Gao Zhen(高震), Wei Ping(韦萍). Study and application of coupled multienzyme reaction systems[J]. *Chem Ind Engin Prog*, 2004, **23**(8): 864–868.
- [44] Rui Xue, John M. Woodley. Process technology for multi-enzymatic reaction systems [J]. *Biore Technol*, 2012, **115**: 183–195.
- [45] Bommarius A S, Schwarm M, Drauz K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives[J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 1998, **5**(1/4): 1–11.
- [46] Weckbecker A, Hummel W. Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH [J]. *Micro Enzym Biotransf*, 2005, **17**: 225–238.
- [47] Seisser B, Lavandera I, Faber K, *et al.* Stereocomplementary two-step cascades using a two-enzyme system leading to enantiopure epoxides [J]. *Adv Synth Catal*, 2007, **349**(8/9): 1399–1404.
- [48] Schultheisz H L, Szymczyna B R, Scott L G, Williamson J R. Pathway engineered enzymatic de novo purine nucleotide synthesis [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(8): 499–511.
- [49] Riebel B R, Gibbs P R, Wellborn W B, *et al.* Cofactor regeneration of both NAD⁺ from NADH and NADP⁺ from NADPH: NADH Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. *Adv Synth Catal*, 2003, **345**(6/7): 707–712.
- [50] Römisch W, Eisenreich W, Richter G, Bacher A. Rapid one-pot synthesis of riboflavin isotopomers [J]. *J Org Chem*, 2002, **67**(25): 8890–8894.
- [51] Liu Z, Zhang J, Chen X, Wang P G. Combined biosynthetic pathway for de novo production of udp-galactose: Catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads [J]. *Chem Bio Chem*, 2002, **3**(4): 348–355.
- [52] Schultheisz H L, Szymczyna B R, Scott L G, *et al.* Pathway engineered enzymatic de novo purine nucleotide synthesis [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(8): 499–511.
- [53] Koeller K M, Wong C-H. Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies [J]. *Chem Rev*, 2000, **100**(12): 4465–4494.
- [54] David Mangan, Iain Miskelly. A three-enzyme system involving an ene-reductase for generating valuable chiral building blocks [J]. *Adv Synth Catal*, 2012, **354**: 2185–2190.
- [55] Yang Sheng(杨晟), Fang Wen-chao(范文超), Tao Rong-sheng(陶荣盛), *et al.* Method for producing L-2-aminobutyric acid. CN[P], C12P13/04, 2011-10-12.
- [56] Eulsoo Park, Minji Kim, Jong-Shik Shin. One-pot conversion of l-threonine into l-homoalanine: biocatalytic production of an unnatural amino acid from a natural one [J]. *Adv Synth Catal*, 2010, **352**: 3391–3398.
- [57] Xin Yan-Fei, Li Xin, Hao Bin, *et al.* Indispensable but Insufficient role of renal d-amino acid oxidase in chiral inversion of N^G-Nitro-D-arginine [J]. *Chem & Biodi*, 2010, **7**: 1413–1423.
- [58] Zimmermann V, Hennemann H-G, Daußmann T, Kragl U. Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetylglucosamine—new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(3): 597–605.
- [59] Koszelewski D, Lavandera I, Clay D, *et al.* Asymmetric synthesis of optically pure pharmacologically relevant amines employing ω -transaminases [J]. *Adv Synth Catal*, 2008, **350**(17): 2761–2766.
- [60] Elina Siirola, Francesco G. Asymmetric synthesis of 3-substituted cyclohexylamine derivatives from prochiral diketones via three biocatalytic steps [J]. *Adv Synth Catal*, 2013, **355**: 1703–1708.
- [61] Maria Caterina Fragnelli, Pilar Hoyos, Diego Romano, *et al.* Enantioselective reduction and deracemisation using the non-conventional yeast *Pichia glucozyma* in water/organic solvent biphasic systems: preparation of (S)-1, 2-diaryl-2-hydroxyethanones (benzoins) [J]. *Tetrahedron*, 2012, **68**: 523–528.
- [62] Suyog M A, Linga Banoth, Uttam C B. One-pot synthesis of (R)-1-(1-naphthyl) ethanol by stereoinversion using *Candida parapsilosis* [J]. *Tetra Lett*, 2013, **54**: 3274–3277.
- [63] Xiao Qing Mu, Yan Xu, Ming Yang, *et al.* New kinetic and thermodynamic approach of one-pot synthesis of chiral alcohol by oxidoreductase from *Candida parapsilosis* [J]. *Proce Biochem*, 2011, **46**: 233–239.
- [64] Nobuyuki Urano, Satoko Fukui, Shoko Kumashiro, *et al.* Directed evolution of an aminoalcohol dehydrogenase for efficient production of double chiral aminoalcohols [J]. *J Biosci Bioengin*, 2011, **111**(3): 266–271.
- [65] Rongzhen Zhang, Yan Xu, Rong Xiao, *et al.* Efficient one-step production of (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol from (R)-enantiomer plus NAD⁺-NADPH in-situ regeneration using engineered *Escherichia coli* [J]. *Micro Cell Fact*, 2012, **11**: 167–175.

- [66] Liu Er-chang (刘二畅), Yang Ding-qiao (杨定乔), Dong Jian-xia (董建霞). Development of modern chiral medicine synthesis[J]. *Acade J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报). 2004, **20**(6): 665–668.
- [67] Rachwalski M, Vermue N, Rutjes F P J T. Recent advances in enzymatic and chemical deracemisation of racemic compounds[J]. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(24): 9268–9282.
- [68] Wang Lei (王雷), Xue Ping (薛屏). Research progress of dynamic kinetic resolution for preparation of chiral compounds[J]. *Appl Chem Ind* (应用化工), 2010, **39**(2): 258–263.
- [69] Mantarosie L, Coman S, Parvulescu V I. Comparative behavior of various lipases in benign water and ionic liquids solvents[J]. *J Mol Catal A: Chem*, 2008, **279**(2): 223–229.
- [70] Dinh P M, Howarth J A, Williams J M J. Catalytic racemisation of alcohols; applications to enzymatic resolution reactions[J]. *Tetra Lett*, 1996, **37**(42): 7623–7626.
- [71] Pilar Hoyos, Vittorio Pace. Dynamic kinetic resolution via hydrolase-metal combo catalysis in stereoselective synthesis of bioactive compounds[J]. *Adv Synth Catal*, 2012, **354**: 2585–2611.
- [72] Madeleine C Warner, Grigory A Shevchenko, Jan-E Bäckvall. Dynamic kinetic resolution of homoallylic alcohols; application to the synthesis of enantiomerically pure 5, 6-dihydropyran-2-ones and δ -lactones[J]. *Chem Eur J*, 2013, **19**: 13859–13864.
- [73] Kim N, Ko S B, Kwon M S. Air-stable racemization catalyst for dynamic kinetic resolution of secondary alcohols at room temperature[J]. *Org Lett*, 2005, **7**(20): 4523–4526.
- [74] Dai Xiao-ting (戴晓庭), Wu Jian-ping (吴坚平), Meng Xiao (孟杲), *et al.* Preparation of (R)-1-aminoindan by dynamic kinetic resolution[J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2014, DOI: 10.6023/cjoc201311048.
- [75] Xu Gang, Dai Xiao-ting, Fu Si-min, *et al.* Efficient dynamic kinetic resolution of arylamines with Pd/layered double-hydroxide-dodecyl sulfate anion for racemization[J]. *Tetra Lett*, 2014, **55**: 397–402.
- [76] Lau Sie Yon, Fadzil Noor Gonawan, Azlina Harun, *et al.* Enzymatic deracemization of (R, S)-Ibuprofen ester via lipasecatalyzed membrane reactor[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2013, **52**: 9441–9453.
- [77] Kitamura M, Tokunaga M, Noyori R. Quantitative expression of dynamic kinetic resolution of chirally labile enantiomers; stereoselective hydrogenation of 2-substituted 3-oxo carboxylic esters catalyzed by BNAP-ruthenium (II) Complexes[J]. *J Amer Chem Soc*, 1993, **115**(1): 144–152.
- [78] Sergey V P, Christopher A R, Ryan A S. Stereoinversion of tertiary alcohols to tertiary-alkyl isonitriles and amines[J]. *Nature*, 2013, **501**: 195–199.
- [79] Wang Shi-zhen, Wu Jian-ping, Xu Gang, *et al.* Chemo-enzymatic asymmetric synthesis of S-citalopram by lipase-catalyzed cyclic resolution and stereoinversion of quaternary stereogenic center[J]. *Biopro Bios Eng*, 2013, **36**: 1031–1037.
- [80] Dunsmore C J, Carr R, Fleming T, *et al.* A chemo-enzymatic route to enantiomerically pure cyclic tertiary amines[J]. *J Amer Chem Soc*, 2006, **128**(7): 2224–2226.
- [81] Zhao Shan-shan (赵姗姗), Lu Hua (卢华), Zhang Yue-cheng (张月成), *et al.* Application of D(-)-Dipyrldimethyl tartaric acid amide in the synthesis of esomeprazole through asymmetric oxidation[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2012, **26**(1): 46–51.
- [82] Hu Juan (胡娟), Wang Dao-yong (王道永), Zheng Zhuo (郑卓), *et al.* Rh-catalyzed asymmetric hydrogenation of α -enol ester phosphonates with 1-phenylethylamine-derived phosphine-phosphoramidite ligands[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2012, **26**(6): 487–492.
- [83] Yang Chao-fen (杨朝芬), Yang Jun (杨俊), Zhu Yan-qin (朱艳琴), *et al.* Asymmetric hydrogenation of acetophenone and its derivatives catalyzed by L-proline modified Ir γ -Al₂O₃[J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2012, **27**(6): 507–514.
- [84] Peter J Deuss. Bioinspired catalyst design and artificial metalloenzymes[J]. *Chem Eur J*, 2011, **17**: 4680–4698.
- [85] Pawel Dydio, Dzik W I, Martin Lutz, *et al.* Remote supramolecular control of catalyst selectivity in the hydroformylation of alkenes[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, **50**: 396–400.