

# 基于非天然叔胺辅因子的人工酶创制及应用

魏亚<sup>#</sup>, 陈崇文<sup>#</sup>, 童颖佳, 周志<sup>\*</sup>

江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

魏亚, 陈崇文, 童颖佳, 周志. 基于非天然叔胺辅因子的人工酶创制及应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 376-384.

WEI Ya, CHEN Chongwen, TONG Yingjia, ZHOU Zhi. Enzymatic MBH reaction catalyzed by an artificial enzyme designed with the introduction of an unnatural tertiary amine cofactor[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 376-384.

**摘要:** 生物酶元件作为合成生物学系统的芯片对生物制造产业有着至关重要的作用。发展多样性新功能酶元件可为合成生物学系统提供丰富的工具箱并助力其发展。本研究报道了一种基于非天然辅因子的新型人工酶构建方法, 通过非天然氨基酸结合点击化学策略将 4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)辅因子通过共价键引入至优选蛋白骨架中, 成功构建了一种以叔胺辅因子为催化中心的新型人工酶。该人工酶成功实现了一例环状烯酮与对硝基苯甲醛之间发生的非天然不对称 Morita-Baylis-Hillman (MBH)反应, 转化率达 90%、对映选择性(*e.e.*)为 38%。本研究不仅为新型人工酶的设计提供了一种有效策略, 而且为发展酶催化非天然 MBH 反应建立了理论基础。

**关键词:** 遗传密码子扩展; 人工酶; MBH 反应; 生物催化; 不对称催化

## Enzymatic MBH reaction catalyzed by an artificial enzyme designed with the introduction of an unnatural tertiary amine cofactor

WEI Ya<sup>#</sup>, CHEN Chongwen<sup>#</sup>, TONG Yingjia, ZHOU Zhi<sup>\*</sup>

School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** As the chip of synthetic biology, enzymes play a vital role in the bio-manufacturing industry. The development of diverse functional enzymes can provide a rich toolbox for the

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0911500); 国家自然科学基金(22207043); 江苏省自然科学基金重大项目(BK20220022); 江苏省自然科学基金(BK20221092)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0911500), the National Natural Science Foundation of China (22207043), the Major Project of Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20220022), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221092).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: zhouzhi@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-03-14; Accepted: 2024-07-15; Published online: 2024-07-16

development of synthetic biology. This article reports the construction of an artificial enzyme with the introduction of a non-natural cofactor. By introducing the 4-dimethylaminopyridine (DMAP) cofactor into the optimal protein skeleton *via* covalent bonds based on a click-chemistry strategy, we successfully constructed a novel artificial enzyme with the DMAP cofactor as the catalytic center. The artificial enzyme successfully catalyzed an unnatural asymmetric Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction between cycloketenone and *p*-nitrobenzaldehyde, with a conversion rate of 90% and enantioselectivity (*e.e.*) of 38%. This study not only provides an effective strategy for the design of new artificial enzymes but also establishes a theoretical basis for the development of unnatural biocatalytic MBH reactions.

**Keywords:** genetic codon expansion; artificial enzyme; Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction; biocatalysis; asymmetric catalysis

近年来,生物合成技术因其显著优势在多个领域得到了广泛应用。酶蛋白作为生物催化剂,因其高催化效率和温和的反应条件,适用于发展绿色化学。与传统化学方法相比,酶催化反应不仅更加经济,还具有高度的专一性和选择性,这使其在医药、纺织、化工等行业中发挥着越来越重要的作用<sup>[1]</sup>。通过生物合成,可以更加高效、环保地生产各种功能性分子,推动人类社会的可持续发展。

迄今为止,将酶应用于有机催化已经有一个多世纪的历史,然而由于天然酶催化的反应类型有限,不能完全满足复杂多样的有机合成反应对于催化剂的要求<sup>[2-3]</sup>。因此,扩大酶的种类以实现其功能多样化正在成为生物催化领域研究的热点。人工酶是由人类设计的具有类似天然酶活性的催化剂,通过设计可以使人工酶具有更加多样的反应活性中心以及更加灵活可控的反应位点,可以实现天然酶无法催化的反应。目前,人工酶创制的主要策略包括:通过遗传密码子扩展技术直接引入非天然氨基酸作为催化中心;以共价或非共价连接的方式引入催化活性辅因子<sup>[4-7]</sup>。目前,研究人员已通过这些方法创建了多种新型人工酶并成功实现了多例人工酶催化的非天然反应<sup>[8-9]</sup>。

4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine,

DMAP)作为一种高效的有机催化剂,近年来广泛应用于有机合成当中,可催化多种类型的加成与环加成反应。目前,DMAP在精细化学品医药、农药、染料、香料等产品的合成中得到广泛应用<sup>[10-12]</sup>。MBH (Morita-Baylis-Hillman)反应作为高效构建碳碳键的方法,可以在DMAP的催化下实现烯烃与醛酮之间的碳-碳成键反应<sup>[13-14]</sup>。近些年来众多手性DMAP型化学催化剂被开发出来应用于不对称MBH反应并取得了一定的成果<sup>[15-17]</sup>。相比之下,生物催化的不对称MBH反应研究较少。比如Green团队<sup>[18]</sup>通过计算机辅助设计开发了一种新型人工酶,该酶以N-甲基组氨酸代替原来位置的组氨酸,实现了环己烯酮与对硝基苯甲醛之间MBH反应的不对称催化。但是,目前有关酶催化MBH反应的研究相对较少<sup>[19-22]</sup>。

基于此,设计构建一种含DMAP催化中心的新型人工酶用于催化多样性不对称非天然反应,将会有效扩展酶的多样性和应用范围。本研究将探索向蛋白中引入含叠氮非天然氨基酸并通过click连接的策略,向目标蛋白中引入一种DMAP型人工催化中心,构建一种新型含DMAP的人工酶,进行MBH反应探索(图1),合成手性新分子,并期望将其应用于有机、材料、药物研发等各个领域<sup>[23-24]</sup>。

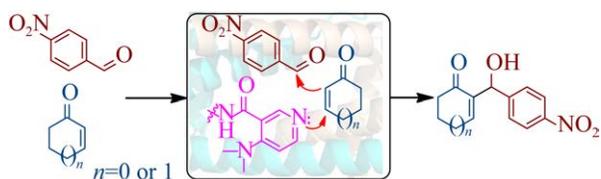


图1 含 DMAP 辅因子的人工酶催化 MBH 反应  
Figure 1 Biocatalytic MBH reaction by artificial enzyme harboring.

本研究的目标蛋白为乳球菌多药耐药调节蛋白(lactococcal multidrug resistance regulatory protein, LmrR),这是一种同源二聚体蛋白,在其二聚体界面处具有较大的疏水性和混杂口袋,是人工酶构建的良好载体<sup>[25]</sup>。目前, Roelfes 团队已经通过遗传密码子扩展技术及  $\pi$ - $\pi$  堆积作用将多种催化活性基团引入至 LmrR 的疏水口袋并实现了环丙化、付克烷基化等<sup>[26-27]</sup>非天然不对称催化反应。这些研究表明 LmrR 在人工酶构建中具有较大的应用潜力。

基于目标研究蛋白,本研究通过生物正交反应的策略将新设计的 DMAP 催化基团引入蛋白口袋中,构建新型人工酶。首先将运用成熟的体系将非天然对叠氮基苯丙氨酸(para-azidophenylalanine, pAzF)<sup>[9]</sup>引入 LmrR 蛋白中的 15 号位置,将得到的突变体命名为 LmrR\_V15pAzF,再通过基于铜催化的叠氮-炔基的环加成反应(copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC)<sup>[28]</sup>将设计合成的含 DMAP 催化活性基团引入至蛋白骨架中,成功构建了新型含 DMAP 型催化中心的人工酶,命名为 LmrR\_V15Mod\_DMAP,通过蛋白质谱实验确定了人工酶结构,发现此人工酶可有效地催化环状烯酮与对硝基苯甲醛的不对称 MBH 反应,并获得较好的转化率和 38%的对映选择性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和

*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株均由本研究室保藏,前者用于重组菌的构建,后者用于质粒的提取。

#### 1.1.2 质粒

pEvol\_pAzF (Addgene 质粒号:31186)由本实验室保藏;pET17b\_LmrR 质粒由本实验室保藏,利用定点突变技术将 LmrR 蛋白中第 15 位氨基酸密码子突变为 TAG 用于后续的非天然氨基酸引入,得到的突变质粒为 pET17b\_LmrR\_V15TAG,用于目标蛋白的表达。

#### 1.1.3 试剂

对硝基苯甲醛、环戊烯酮均购自上海毕得医药科技股份有限公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、脱硫生物素均购自上海泰坦科技股份有限公司;色谱纯的正己烷和异丙醇均购自上海泰坦科技股份有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

#### 1.1.4 常用培养基

LB 培养基:1%蛋白胨、1%氯化钠和 0.5%酵母提取物,pH 约为 7.0,121  $^{\circ}$ C 灭菌 20 min,用于大肠杆菌的培养。

#### 1.1.5 常用仪器

高效液相色谱系统购自安捷伦科技有限公司和岛津公司,旋转蒸发仪、离心机均购自 Eppendorf 公司,超净工作台购自江苏苏净集团有限公司,超微量分析仪购自 Thermo 公司,恒温振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组大肠杆菌的构建

将 pET17b\_LmrR\_V15TAG、Pevol\_pAzF 质粒共转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,经氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)、氯霉素(50  $\mu$ g/mL)筛选菌落,挑取阳性菌落进行扩大培养,取 1 mL 菌液加入 1 mL 灭菌的甘油:水(1:1)冻存。

### 1.2.2 重组菌的诱导表达、纯化及鉴定

将重组菌接种于 10 mL LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 14 h 后取 250  $\mu$ L 接种于

500 mL 新鲜的灭菌 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 5–6 h, 待其  $OD_{600}$  至 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 阿拉伯糖至终浓度为 1 mmol/L, 对叠氮基苯丙氨酸至终浓度为 1 mmol/L, 30 °C、200 r/min 诱导培养 16 h。收集菌液, 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min 收集菌体沉淀, 加入 15 mL PBS (pH=8.0) 重悬, 然后进行超声破碎, 破碎参数为功率 200 W, 开 10 s, 关 15 s, 30 min。破碎后加入 DNA 酶, 冰上静置孵育 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 50 min, 将上清用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后装入 Strep-Tactin 柱中, 4 °C、20 r/min 孵育 1 h。取出层析柱, 收集流出液(flow), 采用 2 倍柱体积的 Washing buffer 进行蛋白洗杂, 重复 3 次, 收集洗杂液(W1–W3), 用 1 倍柱体积的 Elution buffer 进行蛋白洗脱, 重复 6 次, 收集洗脱液(E1–E6), 获得的蛋白为 LmrR\_V15pAzF。将纯化蛋白过程中的分段收集液进行 SDS-PAGE 分析, 最后将 E2–E5 进行超滤浓缩, 浓缩后的蛋白置于 PBS (pH=6.5) 中透析并保存备用。

### 1.2.3 辅因子制备与表征

将 4-(二甲氨基)烟酸、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC)、1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole, HoBt)、炔丙胺加入二氯甲烷中, 氩气保护条件下, 室温搅拌 18 h, 旋干后使用硅胶柱层析纯化产物, 二氯甲烷: 甲醇=10:1 时收集流出段, 获得产物。终产物经  $^1\text{H NMR}$  进行分析与表征。

### 1.2.4 人工 DMAP 辅因子的制备和蛋白连接

将 LmrR\_V15pAzF 蛋白置于 PBS (pH=7.0) 中透析, 按照如下体系进行蛋白连接。总体积 1 mL, LmrR\_V15pAzF: 50  $\mu$ mol/L; 辅因子: 100  $\mu$ mol/L;  $\text{CuSO}_4$ : 100  $\mu$ mol/L; 三-(3-羟基丙基三唑基甲基)胺: 500  $\mu$ mol/L; 抗坏血酸钠: 5 mmol/L。常温下连接 2 h。蛋白连接完成后将

其置于 PBS (pH=7.5) 中透析, 获得产物命名为 LmrR\_V15Mod\_DMAP。

### 1.2.5 对硝基苯甲醛与不饱和烯酮的生物催化体系构建

首先将 LmrR\_V15Mod\_DMAP 蛋白分别置于 pH 为 6.5、7.5、8.0、9.0 的 PBS 中进行透析, 透析结束后使用超微量分析仪测量其浓度备用; 再分别将对硝基苯甲醛与不饱和酮(环戊烯酮或环己烯酮)配制成浓度分别为 25 mmol/L、125 mmol/L 的母液备用。

取 2 mL 反应管 4 个, 先分别加入 pH 为 6.5、7.5、8.0、9.0 的 PBS, 再分别加入对硝基苯甲醛与环戊烯酮母液各 12  $\mu$ L, 最后加入分别经 pH 为 6.5、7.5、8.0、9.0 的 PBS 透析过的人工酶, 反应体系总体积为 300  $\mu$ L, 人工酶浓度为 5 mol%。反应条件为: 4 °C, 20 r/min, 20 h。每个 pH 设置 1 组重复试验, 1 组空白对照试验。

取 2 mL 反应管 2 个, 先分别加入 pH 为 7.5、8.0 的 PBS, 再分别加入对硝基苯甲醛与环己烯酮母液各 12  $\mu$ L, 最后分别加入经 pH 为 7.5、8.0 的 PBS 透析过的人工酶, 反应体系总体积为 300  $\mu$ L, 人工酶浓度为 5 mol%。反应条件为: 4 °C, 20 r/min, 20 h。每个 pH 设置 1 组重复试验、1 组空白对照试验。

### 1.2.6 催化产物的表征

按照 1.2.5 构建反应体系, 反应结束后加入 1 mL 乙酸乙酯进行萃取, 振荡后离心 1 min, 轻轻吸取 950  $\mu$ L 上层液, 加入无水硫酸钠干燥, 离心 1 min 后取 800  $\mu$ L 过滤, 用旋转蒸发器旋干后, 加入 200  $\mu$ L 正己烷: 异丙醇=80:20 复溶, 取 120  $\mu$ L 进行 HPLC 分析。分析条件为: 所用手性柱为 OJ-H 柱, 流动相为正己烷: 异丙醇=90:10, 流速为 0.7 mL/min, 数据采集时间为 45 min。

### 1.2.7 产物外消旋体的制备与表征

以咪唑作为催化剂进行 MBH 反应外消旋体的合成<sup>[29]</sup>, 采用  $^1\text{H NMR}$  对外消旋体进行表

征与确认, 所用溶剂为氘代氯仿。环戊烯酮与对硝基苯甲醛的 MBH 反应产物 **3a**:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  8.24 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H), 7.31 (td,  $J=2.7, 1.2$  Hz, 1H), 5.70 (s, 1H), 3.63 (s, 1H), 2.66 (tdd,  $J=4.3, 2.7, 1.5$  Hz, 2H), 2.51 (ddd,  $J=5.7, 2.7, 1.3$  Hz, 2H)。环己烯酮与对硝基苯甲醛的 MBH 反应产物 **3b**:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Chloroform- $d$ ):  $\delta$  8.20 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 6.87 (t,  $J=3.9$  Hz, 1H), 5.63 (d,  $J=5.7$  Hz, 1H), 3.68 (d,  $J=5.7$  Hz, 1H), 2.46 (m, 4H), 2.01 (m, 2H)。HPLC 分析条件为: 所用手性柱为 OJ-H 柱, 流动相为正己烷: 异丙醇=90:10, 流速为 0.7 mL/min, 数据采集时间为 45 min。产物 **3a** 保留时间分别为 21.6 min、25.2 min; 产物 **3b** 保留时间分别为 34.2 min、40.8 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工酶的分析与表征

#### 2.1.1 DMAP 型辅因子的制备与表征

按照 1.2.3 中的方法制备 DMAP 型辅因子, 获得终产物 43 mg, 产率为 39%。 $^1\text{H NMR}$  分析结果如下:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  8.55 (s, 1H), 8.31 (d,  $J=5.9$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J=5.9$  Hz, 1H), 4.25 (dd,  $J=5.4, 2.5$  Hz, 2H), 2.94 (s, 6H), 2.29 (t,  $J=2.6$  Hz, 1H)。

#### 2.1.2 LmrR\_V15pAzF 的表达与表征

将纯化的 LmrR\_V15pAzF 进行蛋白表征与分析, SDS-PAGE 的结果如图 2 所示, 其在 15 kDa 处有明显的条带, LmrR\_V15pAzF 理论分子量约为 14.9 kDa, 这表明已经成功诱导表达 LmrR\_V15pAzF 蛋白并成功使用 Strep-Tactin 亲和层析柱纯化。

通过对蛋白结构的分析发现, LmrR 蛋白是一个二聚体蛋白, 如图 3 所示, 其二聚体界面间具有一个较大的疏水空腔, 而 V15 恰好位于该疏水空腔中, 并且其氨基酸侧链朝向疏水空腔的内部, 因此将其作为非天然氨基酸的引入位

点<sup>[30-31]</sup>。疏水口袋有利于后续的辅因子的连接以及催化反应的进行, 也更利于后续的定向进化以及蛋白改造。

#### 2.1.3 LmrR\_V15pAzF 与辅因子连接后的人工酶分析

按照 1.2.4 中的方法进行酶蛋白与辅因子进行连接, 该连接基于 CuAAC, 可以迅速完成辅因子的炔基与 LmrR\_V15pAzF 中的叠氮基团之间的 click 反应(图 4)。连接完成后经过透析, 进行液相-质谱联用表征, 结果如图 5 所示, 其理

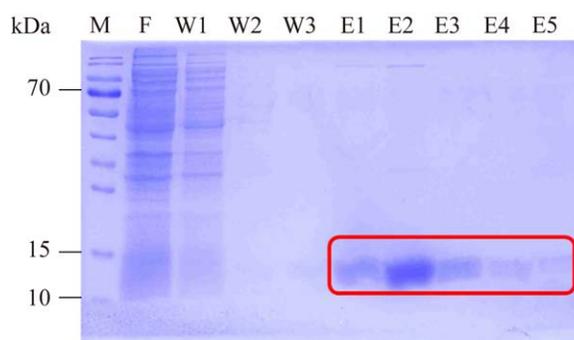


图 2 LmrR\_V15pAzF 纯化收集液的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified LmrR\_V15pAzF collection solution. M: Protein marker; F: Flow; W1–W3: Washing buffer; E1–E5: Elution buffer.

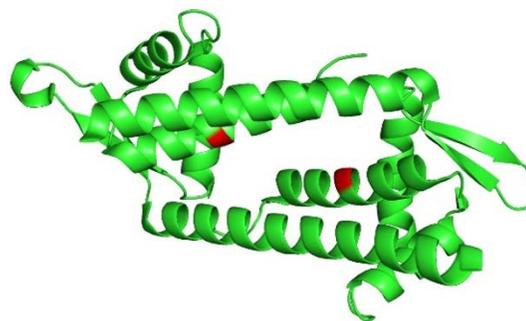


图 3 LmrR 的二聚体结构 PDB 登录号: 6I8N, V15 位用红色表示。

Figure 3 The dimer structure of LmrR. PDB ID: 6I8N, V15 is shown in red.

论分子量为 15 263.00 Da, 实际测定结果为 15 263.00 Da, 质谱结果表明已成功将辅因子与 LmrR\_V15pAzF 相连接, 并且该连接过程具有极高的效率以及特异性。将所获得的人工酶命名为 LmrR\_V15Mod\_DMAP。

基于 DMAP 型辅因子的潜在催化活性, 可以利用其进行底物的活化, 加之蛋白骨架提供的手性环境, 有望实现非天然反应的不对称催化以及新型分子砌块的合成。

## 2.2 LmrR\_V15Mod\_DMAP 催化对硝基苯甲醛与环戊烯酮的 MBH 反应

由于 MBH 反应在有机合成中具有重要的

地位, 其反应产物具有极其广泛的应用, 因此, 本研究中利用所创制的新型人工酶进行不饱和酮与对硝基苯甲醛之间的 MBH 反应探索, 以期实现该反应的不对称催化。首先按照 1.2.5 构建生物催化反应体系, 反应 pH 分别为 6.5、7.5、8.0、9.0, 按照 1.2.6 中的方法进行反应产物的测定, 通过与外消旋体高效液相色谱分析的保留时间以及化合物的吸收光谱确定产物。结果如图 6 所示, 由于 MBH 反应需要一个相对碱性的条件, 在反应 pH 为 6.5 时, 底物几乎不转化, 而当反应体系的碱性增强, 反应的背景也随之增高。在 pH7.5 时, 人工酶催化反应组可获得 72% 的

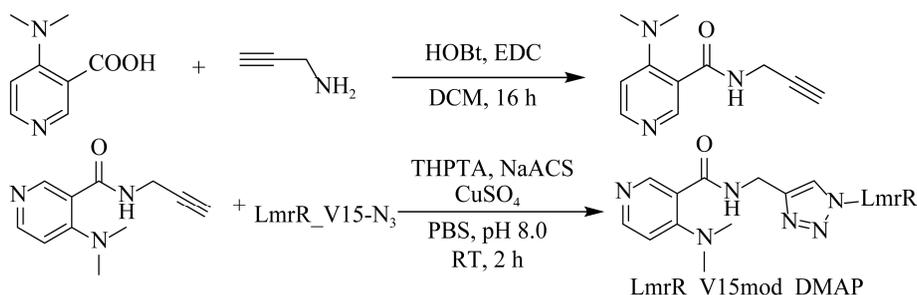


图 4 人工辅因子的合成和与蛋白 LmrR\_V15pAzF 的偶联 EDC: 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐; HOBt: 1-羟基苯并三唑; THPTA: 三(3-羟丙基三氮基甲基)胺; NaACS: 抗坏血酸钠。

Figure 4 The synthesis of artificial cofactor and the click reaction with LmrR\_V15pAzF. EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; HOBt: 1-hydroxybenzotriazole; THPTA: Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine; NaACS: Sodium L-ascorbate.

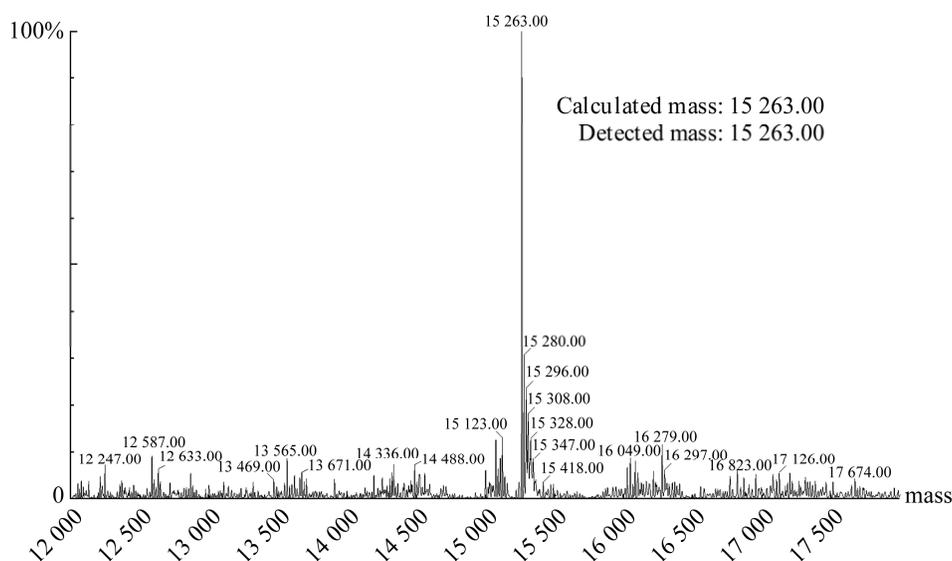


图 5 LmrR\_V15Mod\_DMAP 的 LC-MS 分析  
Figure 5 LC-MS analysis of LmrR\_V15Mod\_DMAP.

转化率和 16% *e.e.*, 说明人工酶在该反应中起到相应的催化作用, 同时空白对照组显示一定的背景反应; 当 pH 升高至 8.0 时, 人工酶催化该反应获得 90% 的转化率和 19% 的 *e.e.*。但是当反应体系 pH 增加到 9.0 时, 酶催化组产生的产物为消旋体, 出现这一现象的原因可能是反应体系碱性的增强使得烯醇  $\alpha$  位碳原子更容易活化, 使背景反应增强, 无需酶的参与, 从而失去了反应的立体选择性。另外单独加入相同浓度的 DMAP 分子催化该反应的结果与空白对照一致, 无立体选择性和转化率的提升, 结果表明 DMAP 分子在水相条件下对该反应无明显催化效果。

### 2.3 LmrR\_V15Mod\_DMAP 催化对硝基苯甲醛与环己烯酮的 MBH 反应

按照 1.2.5 中的方法构建生物催化反应体系, 当反应 pH 为 7.5 和 8.0 时均显示出明显的酶参与催化的过程, 按照 1.2.6 中的方法进行反应产物的测定, 通过与外消旋体高效液相色谱分析的保留时间以及化合物的吸收光谱确定产物。结果如图 7

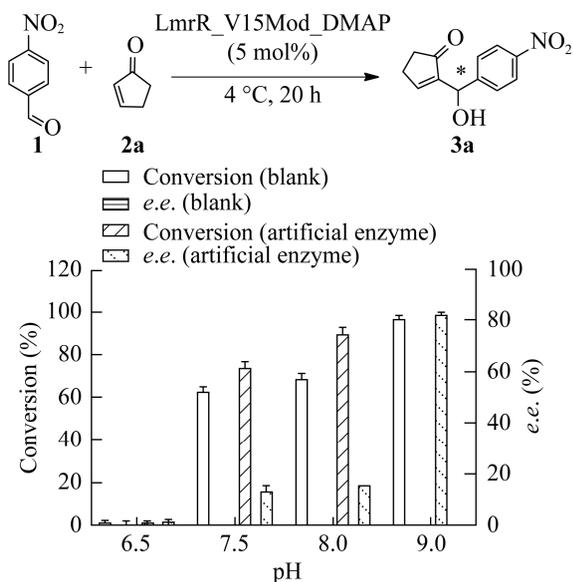


图 6 人工酶催化环戊烯酮与对硝基苯甲醛的 MBH 反应

Figure 6 The MBH reaction of cyclopentenone with *p*-nitrobenzaldehyde catalyzed by artificial enzyme.

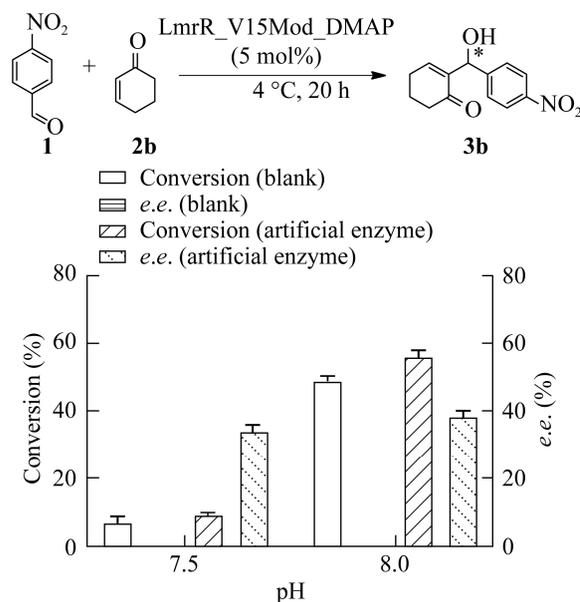


图 7 人工酶催化环己烯酮与对硝基苯甲醛的 MBH 反应

Figure 7 The MBH reaction of cyclohexenone with *p*-nitrobenzaldehyde catalyzed by artificial enzyme.

所示, 在 pH 为 7.5 及 8.0 的条件下, 人工酶催化该反应的转化率分别为 9% 和 56%, *e.e.* 值分别为 34% 和 38%。相比于环戊烯酮参与的反应, 环己烯酮参与的反应具有更加优异的立体选择性。这可能是因为与环戊烯酮相比, 环己烯酮具有更稳定的六元环结构, 在反应过程中相对较难活化。另外, 环己烯酮的体积较环戊烯酮更大, 在人工酶的活性口袋中的灵活度会更低, 因此其反应产物具有比环戊烯酮更加优异的立体选择性。想要获得更加高效和更好立体选择性的反应转化, 后续还需继续对新构建人工酶进行高通量定向进化。

## 3 讨论与结论

本研究利用遗传密码子扩展技术将含有叠氮基团侧链的非天然氨基酸 pAzF 引入至蛋白骨架中, 获得蛋白 LmrR\_V15pAzF, 其中非天然叠氮基团与含炔基的 DMAP 辅因子通过 click

反应与蛋白进行高效的共价连接,成功构建了含 DMAP 催化活性基团的新型人工酶,过程简单高效、特异性强,相比于利用非天然氨基酸直接引入作为酶催化中心,本策略具有更好的拓展性,可快速高效地将多种催化中心引入蛋白中构建新功能人工酶。

新创制含 DMAP 催化中心的人工酶可催化环戊烯酮、环己烯酮与对硝基苯甲醛之间的非天然不对称 MBH 反应。此反应的进行受 pH 影响较大,在适合的 pH 范围内(7.5–8.0)可观测到明显的酶催化过程,合成相应的手性产物。在后续的研究中,可结合计算机辅助设计和定向进化策略,进一步提高反应的立体选择性和收率。此种含 DMAP 型辅酶的人工酶也有望实现其他类型叔胺催化的反应,如 Rauhut-Currier 反应,本课题组后续将会继续探索。

综上所述,本研究创制了一类新型含非天然 DMAP 催化中心的人工酶,并实现了一例人工酶催化的不对称 MBH 反应,为新型人工酶的创制提供了简单高效的方法,为拓展酶催化非天然反应提供了一种新的策略。

## REFERENCES

- [1] REETZ MT. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(34): 12480-12496.
- [2] ROBERT JM, BETANCUR MO, MACHADO ACO, ARRUDA A, REIS VCB, ALMEIDA RV, TORRES FAG, ALEGRE PF, VALERO F, FREIRE DMG. Increase of *Candida antarctica* lipase B production under PGK promoter in *Pichia pastoris*: effect of multicopies[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(2): 405-413.
- [3] AGOSTINI F, VÖLLER JS, KOKSCH B, ACEVEDO-ROCHA CG, KUBYSHKIN V, BUDISA N. Biocatalysis with unnatural amino acids: enzymology meets xenobiology[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(33): 9680-9703.
- [4] DONG ZY, LUO Q, LIU JQ. Artificial enzymes based on supramolecular scaffolds[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(23): 7890-7908.
- [5] ZHANG NN, SUN ZY, WU CZ. Artificial enzymes combining proteins with proline polymers for asymmetric aldol reactions in water[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(8): 4777-4783.
- [6] YU Y, HU C, XIA L, WANG JY. Artificial metalloenzyme design with unnatural amino acids and non-native cofactors[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(3): 1851-1863.
- [7] SCHWIZER F, OKAMOTO Y, HEINISCH T, GU YF, PELLIZZONI MM, LEBRUN V, REUTER R, KÖHLER V, LEWIS JC, WARD TR. Artificial metalloenzymes: reaction scope and optimization strategies[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 142-231.
- [8] ZHU HQ, TANG XL, ZHENG RC, ZHENG YG. Recent advancements in enzyme engineering via site-specific incorporation of unnatural amino acids[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(12): 213.
- [9] LEVESON-GOWER RB, ZHOU Z, DRIENOVSKÁ I, ROELFES G. Unlocking iminium catalysis in artificial enzymes to create a friedel-crafts alkylase[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(12): 6763-6770.
- [10] REDDY VR, MARIPALLY N, MUTYALA R, NANUBOLU JB, CHANDRA R. DMAP catalysed vinylogous Rauhut-Currier reaction of allenates with para-quinone methides[J]. *Tetrahedron Letters*, 2018, 59(27): 2631-2635.
- [11] XU JQ, YANG WJ, SHI WY, MAO BM, LIN Y, XIAO YM, GUO HC. DMAP-catalyzed [4+2] annulation of  $\alpha$ -substituted allenates with unsaturated pyrazolones[J]. *Tetrahedron*, 2019, 75(26): 3609-3616.
- [12] KHASHI M, DAVOODNIA A, CHAMANI J. Dmap-catalyzed synthesis of novel pyrrolo[2,3-D] pyrimidine derivatives bearing an aromatic sulfonamide moiety[J]. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2014, 189(6): 839-848.
- [13] MORITA KI, SUZUKI Z, HIROSE H. A tertiary phosphine-catalyzed reaction of acrylic compounds with aldehydes[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1968, 41(11): 2815.
- [14] MORITA KI, KOBAYASHI T. New addition reactions of acrylic compounds with fumaric acid esters catalyzed by trivalent phosphorus compounds[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1969, 42(9): 2732.
- [15] BUGARIN A, CONNELL BT.  $MgI_2$ -accelerated enantioselective Morita-Baylis-Hillman reactions of cyclopentenone utilizing a chiral DMAP catalyst[J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(15): 2644-2646.
- [16] TAKIZAWA S, MATSUI K, SASAI H. Bifunctional organocatalysts for enantioselective aza-Morita-Baylis-Hillman (aza-MBH) reactions[J]. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 2007, 65(11): 1089-1098.
- [17] MASSON G, HOUSSEMAN C, ZHU JP. The enantioselective Morita-Baylis-Hillman reaction and its aza counterpart[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2007, 46(25): 4614-4628.
- [18] HUTTON AE, FOSTER J, CRAWSHAW R, HARDY FJ, JOHANNISSEN LO, LISTER TM, GÉRARD EF, BIRCH-PRICE Z, OBEXER R, HAY S, GREEN AP. A non-canonical nucleophile unlocks a new mechanistic

- pathway in a designed enzyme[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 1-13.
- [19] BJELIC S, NIVÓN LG, ÇELEBI-ÖLÇÜM N, KISS G, ROSEWALL CF, LOVICK HM, INGALLS EL, GALLAHER JL, SEETHARAMAN J, LEW S, MONTELLIONE GT, HUNT JF, MICHAEL FE, HOUK KN, BAKER D. Computational design of enone-binding proteins with catalytic activity for the Morita-Baylis-Hillman reaction[J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(4): 749-757.
- [20] JIANG L, YU HW. An example of enzymatic promiscuity: the Baylis-Hillman reaction catalyzed by a biotin esterase (BioH) from *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(1): 99-103.
- [21] JOSHI PN, PURUSHOTTAM L, DAS NK, MUKHERJEE S, RAI V. Protein self-assembly induces promiscuous nucleophilic biocatalysis in Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(1): 208-211.
- [22] XUE JW, SONG J, MANION ICK, HE YH, GUAN Z. Asymmetric Morita-Baylis-Hillman reaction catalyzed by pepsin[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 124: 62-69.
- [23] NARENDAR REDDY T, JAYATHIRTA RAO V. Importance of Baylis-Hillman adducts in modern drug discovery[J]. *Tetrahedron Letters*, 2018, 59(30): 2859-2875.
- [24] LIU TY, XIE M, CHEN YC. Organocatalytic asymmetric transformations of modified Morita-Baylis-Hillman adducts[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(11): 4101-4112.
- [25] BERSELLINI M, ROELFES G. Multidrug resistance regulators (MDRs) as scaffolds for the design of artificial metalloenzymes[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15(14): 3069-3073.
- [26] ROELFES G. Repurposed and artificial heme enzymes for cyclopropanation reactions[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, 222: 111523.
- [27] BOS J, BROWNE WR, DRIESSEN AJM, ROELFES G. Supramolecular assembly of artificial metalloenzymes based on the dimeric protein LmrR as promiscuous scaffold[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(31): 9796-9799.
- [28] LIANG LY, ASTRUC D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications: an overview[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2011, 255(23-24): 2933-2945.
- [29] LUO SZ, MI XL, XU H, WANG PG, CHENG JP. Efficient Baylis-Hillman reactions of cyclic enones in methanol as catalyzed by methoxide anion[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69(24): 8413-8422.
- [30] AGUSTIANDARI H, LUBELSKI J, van den BERG van SAPAROE A HB, KUIPERS OP, DRIESSEN AJM. LmrR is a transcriptional repressor of expression of the multidrug ABC transporter LmrCD in *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 759-763.
- [31] ROELFES G. LmrR: a privileged scaffold for artificial metalloenzymes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(3): 545-556.