

# 苏氨酸醛缩酶的催化机理、分子改造及合成应用

陈启佳<sup>1</sup>, 陈曦<sup>2</sup>, 郝建雄<sup>1</sup>, 朱敦明<sup>2</sup>

1 河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

陈启佳, 陈曦, 郝建雄, 等. 苏氨酸醛缩酶的催化机理、分子改造及合成应用. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4215-4230.  
Chen QJ, Chen X, Hao JX, et al. Catalytic mechanism, molecular engineering and applications of threonine aldolases. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4215-4230.

**摘要:** 苏氨酸醛缩酶催化醛和甘氨酸羟醛缩合, 一步反应即可构建产物  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的两个手性中心, 从原子经济性和环境影响角度, 是非常具有潜力的绿色合成光学纯  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的方式之一。多个不同生物来源的苏氨酸醛缩酶得到分离和表征, 较低的  $\beta$ -碳立体选择性以及反应过程中动力学和热力学控制难题, 使其在合成应用中面临很大挑战。文中综述了近年来苏氨酸醛缩酶在基因挖掘、催化机理、高通量筛选与分子改造、合成应用等方面的研究进展, 旨在为进一步研究提供参考。

**关键词:** L-苏氨酸醛缩酶, D-苏氨酸醛缩酶,  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸, 催化机理, 分子改造

## Catalytic mechanism, molecular engineering and applications of threonine aldolases

Qijia Chen<sup>1</sup>, Xi Chen<sup>2</sup>, Jianxiong Hao<sup>1</sup>, and Dunming Zhu<sup>2</sup>

1 College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, Hebei, China

2 National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** Threonine aldolases catalyze the aldol condensation of aldehydes with glycine to furnish  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid with two stereogenic centers in a single reaction. This is one of the most promising green methods for the synthesis of optically pure  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid with high atomic economy and less negative environmental impact. Several threonine aldolases from different origins have been identified and characterized. The insufficient  $\beta$ -carbon stereoselectivity and the challenges of balancing kinetic versus thermodynamic control to achieve the optimal optical purity and yield hampered the application of threonine aldolases. This review summarizes the recent advances in discovery, catalytic mechanism, high-throughput screening, molecular engineering and applications of threonine aldolases, with the aim to provide some insights for further research in this field.

**Keywords:** L-threonine aldolase, D-threonine aldolase,  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid, catalytic mechanism, molecular engineering

**Received:** January 28, 2021; **Accepted:** April 9, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 22001056), Natural Science Foundation of Hebei Province, China (No. B2020208050).

**Corresponding author:** Qijia Chen. Tel/Fax: +86-311-81668472; E-mail: qijia1126@hotmail.com  
国家自然科学基金 (No. 22001056), 河北省自然科学基金 (No. B2020208050) 资助。

$\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸是一类重要的非天然氨基酸，是合成复杂药物分子、天然产物和生物活性物质的重要手性砌块，在医药、食品和精细化工等领域有着广泛的应用。图 1 中列出了基于该结构开发的几种上市药物，如兽用广谱抗生素氟苯尼考 (Florfenicol) 和甲砒霉素 (Thiamphenicol)、治疗帕金森症的屈昔多巴 (Droxidopa)、全球首个口服戈谢病治疗药物依利格鲁司他 (Eliglustat) 等<sup>[1-2]</sup>。 $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸在  $\alpha$ -碳和  $\beta$ -碳上有连续的 2 个手性中心，其双手性中心的高效制备一直是合成化学研究的难点和热点。

鉴于  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的重要性，近年来报道了多种不对称合成方法<sup>[1]</sup>，如动态动力学拆分<sup>[2]</sup>、不对称氢化<sup>[3]</sup>、Sharpless 不对称环氧化<sup>[4]</sup>、Aza-Claisen 重排<sup>[5]</sup>等。这些方法为制备光学纯  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸提供了非常有用的工具，但也同时存在一个或多个方面的不足，如反应条件苛刻、立体选择性不高、合成路线较长和重金属残留等。

酶法合成高附加值手性化合物，已成为绿色化学和化工发展的重要趋势之一<sup>[6]</sup>。苏氨酸醛缩酶 (Threonine aldolases, TAs) 以 5'-磷酸吡哆醛 (Pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 为辅因子，可逆催化醛与甘氨酸羟醛缩合生成  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸，其显著优势在于一步反应即可构建双手性中心，不需要保护和去保护步骤，不产生副产物，是最直接、最吸引人的合成方法之一。目前，已报道的 TAs 同时生成非对映异构体 *threo*- $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸和 *erythro*- $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸，即在  $\alpha$ -碳具有高度立体选择性，但普遍不能严格控制  $\beta$ -碳立体选择性，导致产物的非对映体过量值 (Diastereomeric excess, de 值) 较低<sup>[7]</sup>。已发表的 TAs 综述性文献请参见文献[8-10]，本文系统性地总结了 TAs 在基因挖掘、催化机理、分子改造及合成应用等方面的研究进展，着重阐述了 TAs 所面临的关键科学问题，以及近 5 年研究报道的一些解决方案，以期促进该研究领域的进一步发展，建立高效的光

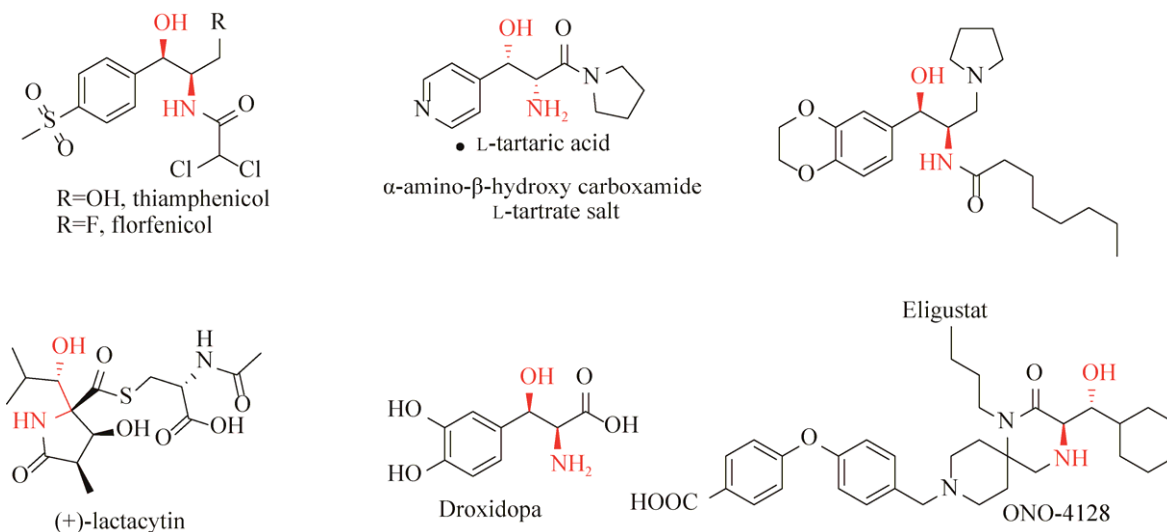


图 1 基于  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸结构开发的药物

Fig. 1 Drugs developed based on  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid structure.

学纯  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的生物合成方法。

## 1 苏氨酸醛缩酶分类与基因挖掘

基于苏氨酸的  $\alpha$ -碳立体选择性, TAs 可分为 L-苏氨酸醛缩酶 (L-TA) 和 D-苏氨酸醛缩酶 (D-TA) (图 2)。根据所生成的 L/D-苏氨酸的  $\beta$ -碳立体选择性, 可细分为 L-苏氨酸醛缩酶 (L-TA, EC 4.1.2.5), 偏好 L-苏氨酸、对 L-别苏氨酸 (L-*allo*-苏氨酸) 活性较低; L-*allo*-苏氨酸醛缩酶 (L-*allo*-TA, EC 4.1.2.49), 偏好 L-*allo*-苏氨酸、对 L-苏氨酸活性较低; 低特异性 L-苏氨酸醛缩酶 (L-low-TA, EC 4.1.2.48), 对 L-苏氨酸和 L-*allo*-苏氨酸无明显偏好; 而对于 D-苏氨酸醛缩酶, 目前仅报道了 D-low-TA (EC 4.1.2.42)。另外, 苯丝氨酸醛缩酶 (EC 4.1.2.26), 对 L-苏氨酸和 L-*allo*-苏氨酸均有活性<sup>[11]</sup>, 亦可归类为苏氨酸醛缩酶。TAs 的分类是基于苏氨酸的立体选择性, 但与其对芳香族  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的立体选择偏好性并不完全一致, Fesko 等发现 L-TA、L-*allo*-TA 和 L-low-TA 催化合成 L- $\beta$ -苯丝氨酸以 L-*threo*/*erythro* 混合物形式存在, 但均以 L-*threo* 构型为主<sup>[12]</sup>。

TAs 在自然界中分布广泛<sup>[9-10,13]</sup>, L-TA 已报道有大肠杆菌 *Escherichia coli*、天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 等来源<sup>[14-23]</sup>; L-*allo*-TA 已报道有简氏气单胞菌 *Aeromonas jandaei*、海栖热袍菌 *Thermatoga maritime* 等来源<sup>[16,24-26]</sup>; L-low-TA 来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 等<sup>[12,27-32]</sup>。D-low-TA 目前

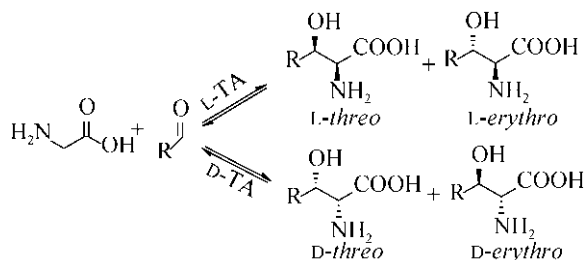


图 2 TAs 催化羟醛缩合反应

Fig. 2 Aldol condensation catalyzed by TAs.

报道较少, 已报道有木糖氧化产碱菌 *Alcaligenes xylooxidans*、水稻黄单胞菌 *Xanthomonas oryzae* 等来源<sup>[12,16,33-37]</sup>。

L-TA 和 D-TA 催化反应类似, 但两者在进化来源和结构上并不相似, 前者属于天冬氨酸转移酶家族, 后者属于丙氨酸消旋酶家族<sup>[38]</sup>。序列相似度网络和系统发育分析将 L-TA 分成 2 个亚家族, 一个亚家族包括原核和真核生物来源, 如 *A. jandaei*、*S. cerevisiae* 等来源, 偏好 L-*allo*-苏氨酸; 另一个亚家族仅含有原核生物来源, 如 *P. putida*、*Pseudomonas* sp. 等来源, 偏好 L-苏氨酸<sup>[39]</sup>。多序列比对发现两个亚家族之间相似性较低, 但均具有部分保守位点, 以 *A. jandaei* 来源的 L-*allo*-TA 为例, 包括与 PLP 形成 Schiff 碱的 Lys199, 与 PLP 和底物相互作用的 His85、His128、Arg171 和 Arg313。D-TA 同样具有形成 Schiff 碱的保守位点 Lys59 (以 *A. xylooxidans* 来源的 D-low-TA 为例), 与 PLP 和底物相互作用的 Gln81, Arg157、Tyr187 和 Ser252, 以及绑定二价金属离子的 His347 和 Asp349。

## 2 晶体结构与催化机理

多个 TAs 晶体结构得到解析, 通过晶体结构分析、突变实验及反应动力学分析等研究, 提出了催化反应机理。L-TA 和 D-TA 在三维结构和催化机理上均有较大差异, 前者是同源四聚体、属于 PLP 依赖的 I 类折叠酶, 后者是同源二聚体、属于 PLP 依赖的 II 类折叠酶。2002 年, Kielkopf 等首次解析了 *T. maritime* 来源的 L-low-TA 晶体结构 (PDB: 1M6S), 该酶具有 4 个活性中心的同源四聚体, 每个亚基含有 2 个结构域, 位于四聚体中间的大结构域由 7 个  $\alpha/\beta$  结构组成, 小结构域由 C 末端和 N 末端的 3-4 个  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠组成<sup>[26]</sup>。含有 L-*allo*-苏氨酸和甘氨酸的共结晶结构 (PDB: 1LW4 和 1LW5) 揭示, Lys199 的氨基与供体底物形成 Schiff 碱中间体而实现对供体底物的活化, 进而生成亲核的烯胺, 选择性地进攻受

体羰基。活性中心 His83 和 His125 起到了较为关键的作用, His83 介导了 *L-allyl*-苏氨酸羟基的去质子化, *L*-苏氨酸裂解过程中起到催化碱作用的可能是 His125 及其附近带负电荷的水分子。

di Salvo 等解析 *E. coli* 来源的 *L*-low-TA (PDB: 4LNJ), 整体结构与 *T. maritime* 来源的相似, 酶活性中心位于亚基结合界面处 (图 3A-B), 由一个亚基和与之相邻两个亚基的 loop 共同构筑而成 (图 3C)<sup>[40]</sup>。反应机理如图 3D 所示, PLP 首先与酶活性中心 Lys197 的氨基形成 Schiff 碱中间体; 底物甘氨酸进入活性中心, PLP 与 Lys197 之间的键断裂, 与底物形成新的中间体, 后者促进了甘氨酸的  $\alpha$ -碳去质子化, 当亲核攻击受体乙醛进入活性中心, 形成含有 C-C 的酰式中间体; 最后 PLP 和 Lys197 重新生成 Schiff 碱中间体, 并释放产物苏氨酸。在 pH 5.6 时,  $\alpha$ -氨基和羧基处于颠

倒的位置, PLP 无法和 Lys197 形成内部亚胺, 从而阻断底物被亲核攻击<sup>[41]</sup>。值得注意的是, 活性中心有多个水分子参与催化反应, 其中一分子水与 PLP 磷酸基团、Ser196 和 Gly204 形成氢键; 一分子水与 PLP 磷酸基团、His126、Lys222 和 Arg229 以及苏氨酸  $\beta$ -羟基相互作用。含有 *L*-丝氨酸和 *L*-苏氨酸的共结晶结构 (PDB: 4LNL 和 4LNM) 表明 His83 和 His126 在反应中并没有起到催化碱的作用, 两个组氨酸残基与活性中心的水分子形成配位, 增强水的碱性使其作为催化碱。His83 和 His126 在影响产物立体选择性上发挥了一定作用, 突变体 H83F 和 H126F 均提高了对 *L*-苏氨酸的偏好性, 但不能严格控制产物的立体选择性。由于活性中心空腔较大, 易于容纳位阻较小和较大的底物, 底物的识别和产物的立体选择性是由与底物相互作用的氨基酸残基及

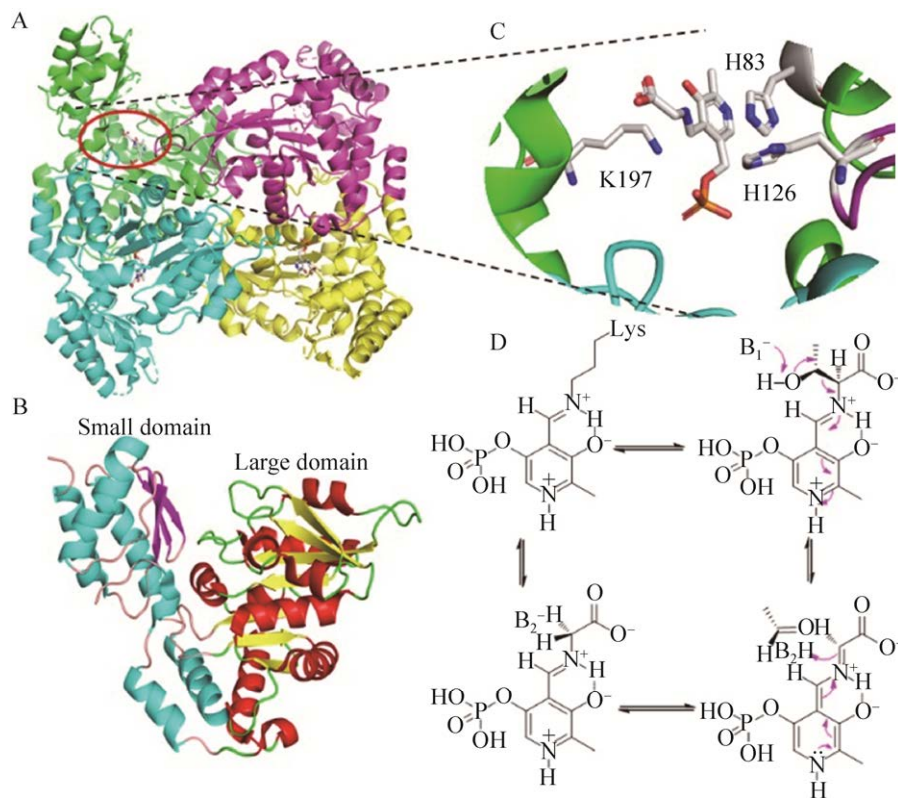


图3 *E. coli* 来源的 *L*-low-TA 的晶体结构 (A)、大、小结构域 (B)、多个亚基构成的活性中心 (C)、催化机理 (D)<sup>[40]</sup>  
Fig. 3 Crystal structure of *L*-low-TA from *E. coli* (A), the large domain and the small domain (B), the active center composed of multiple subunits (C), the catalytic mechanism (D)<sup>[40]</sup>.

附近的水分子共同构筑的酶活中心微环境所决定的，而非某一个或几个氨基酸所决定的，这加大了分子改造 L-low-TA 的难度。

Qin 等筛选 *A. jandaei* 来源 L-*allo*-TA 的随机突变体库 3 000 余个突变体，获得突变体 H128Y/S292R 对 L-苏氨酸和 L-*allo*-苏氨酸的活性分别提高了 8.4 和 2.0 倍<sup>[42]</sup>。H128Y 和 S292R 对 L-*allo*-苏氨酸的  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  值相似，而 H128Y 对 L-苏氨酸的  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  值是 S292R 的 14.5 倍，表明 H128Y 对提高 L-苏氨酸活性起到主要作用。野生型和双突变体的晶体结构 (PDB: 3WGB 和 3WGC) 表明 H128 突变成 Tyr 后，残基侧链从活性位点移出 4.2Å，并与产物 L-苏氨酸的甲基形成疏水作用。进一步将 H128 突变成其他疏水性氨基酸，也通过形成疏水作用而提高 L-苏氨酸的活性。不过 S292R 是如何起作用的，这还不清楚。His85 和 His128 附近的 Glu90 和 Asp126 突变成 Ala 后几乎丧失活性或改变底物偏好性，可能在酶活中心的氢键网络构建和底物识别中起到了协助作用，这与 *E. coli* 来源的 L-low-TA 的底物识别和立体选择性受酶活中心微环境显著影响是相一致的。

Uhl 等首次解析了 *A. xylosoxidans* 来源的 D-low-TA 晶体结构 (PDB: 4V15) 为同源二聚体，每个亚基含有 2 个结构域，大结构域由 8 个  $\alpha\beta$ -桶结构组成，是典型的丙氨酸消旋酶类似结构；小结构域由 C 末端和 N 末端的 8 个  $\beta$ -折叠组成<sup>[43]</sup>。辅因子  $\text{Mn}^{2+}$  结合在 PLP 附近，与 Ser252、Asp321、His347 和 Asp349 这 4 个氨基酸残基相互作用。鉴于未能获得含有产物的共结晶，将 D- $\beta$ -苯丝氨酸对接到活性中心， $\text{Mn}^{2+}$  在催化过程中作为关键 Lewis 酸，与底物  $\beta$ -羟基相互作用并促进 His193 和水分子介导的去质子化过程。叠合该 D-low-TA 和 *T. maritime* 来源的 L-low-TA 活性中心，以辅因子 PLP 为镜像平面，底物  $\beta$ -羟基的去质子化分别由处于 *re*-face 的 His193 和处于 *si*-face 的 His125 所介导，两者呈现镜面对称 (图 4)。另外，来源于莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii*

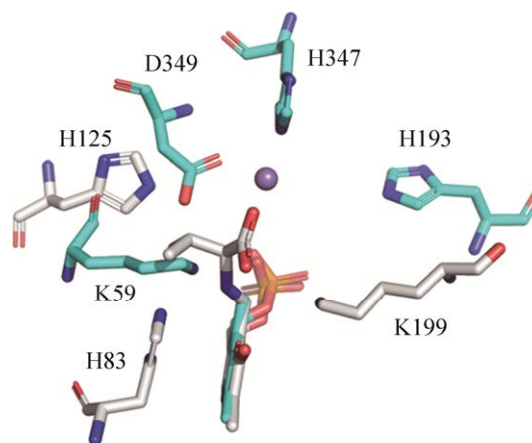


图 4 D-low-TA 和 L-low-TA 活性中心叠合 (D-low-TA 和 L-low-TA 的氨基酸残基分别用蓝色和灰色表示)<sup>[43]</sup>  
Fig.4 Superposition of active central of D-low-TA and L-low-TA (The selected amino acid residues from D-low-TA and L-low-TA are displayed in blue and gray, respectively)<sup>[43]</sup>.

的 D-low-TA 也获得了晶体，但是尚未解析出结构和催化机理<sup>[44]</sup>。

### 3 苏氨酸醛缩酶的催化性质和底物特异性

从原子经济性和环境影响角度考虑，以廉价的非手性甘氨酸和醛为底物，在温和条件下 TAs 催化一步反应即可构建  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的双手性中心，是非常有潜力的绿色合成方法之一。表 1 中列举了详细研究催化性质和底物谱的 TAs。

Kimura 等首次系统性地研究了 *E. coli* 来源的 L-low-TA 和 *X. oryzae* 来源的 D-low-TA 的脂肪醛、芳香醛和杂环醛底物谱及其立体选择性<sup>[37]</sup>。以脂肪醛和芳香醛的代表性底物乙醛和苯甲醛为例，*E. coli* 来源的 L-low-TA 催化反应 3 h，生成以 L-*erythro* 为主的苏氨酸 (转化率 35%，de>99%) 和以 L-*threo* 为主的苯丝氨酸 (转化率 3%，de 值为 42%)；延长反应时间至 24 h，转化率分别提高至 40%和 9%，而 de 值却下降至 82%和 20%。该酶催化短链脂肪醛偏好生成 L-*erythro* 产物，而催化芳香醛偏好生成 L-*threo* 产物。无论脂肪醛还是芳香醛，*X. oryzae* 来源的 D-low-TA

合成产物均以 D-threo 为主。

*Pseudomonas* sp. 来源的 L-low-TA 和 *A. xylosoxidans* 来源的 D-low-TA 的芳香醛和脂肪醛底物谱也进行了详细的研究<sup>[45-46]</sup>。L-low-TA 在 5–40 °C 范围内催化合成苯丝氨酸的 de 值没有明显变化为 98%，升高温度 de 值会显著降低。L-low-TA 在较宽泛的 pH 范围内 (pH 5.5–8.0) 均表现出较高活性，而 D-low-TA 仅在 pH 9.5 展现出较高活性。苯环上取代基团的电负性和位阻效应影响着 TAs 的活性和立体选择性，吸电子取代基团的活性和选择性要优于供电子取代基团的芳香醛。其中，L-low-TA 合成 L-threo-2-氯苯丝氨酸 (de 值为 52%)，L-threo-3-溴苯丝氨酸 (de 值为 55%) 和 L-threo-4-甲砒基苯丝氨酸 (de 值为 53%) 取得了较好的立体选择性控制；最优化条件下，D-low-TA 可高效构建 D-threo-苯丝氨酸 (de 值为 98%)，D-threo-2-氟苯丝氨酸 (de 值为 95%) 和 D-threo-4-甲砒基苯丝氨酸 (de 值为 99%) 的双手性中心。

为了阐明 TAs 催化过程中立体选择性的变化趋势与规律，Shibata 等探究了来源于土生假丝酵母 *Candida humicola* 的 L-low-TA 催化苄氧基丁醛和甘氨酸在动力学和热力学控制下产物立体选择性的变化，15 min 时以 L-erythro 产物为主；延长反应时间使其处于热力学控制，L-threo 产物转化率大幅提高，成为主要产物<sup>[29]</sup>。Fesko 等剖析

了 L-TA、L-allo-TA、L-low-TA 和 D-low-TA 催化合成 L-β-苯丝氨酸过程中立体选择性的变化，反应 1 min 时处于动力学控制，产物 α-碳和 β-碳立体选择性较好，分别倾向于以 L-threo、L-erythro、L-erythro 和 D-threo 为主要产物；当动力学和热力学产物达到平衡，产物均以 threo-β-苯丝氨酸为主，de 值下降到 20% 左右<sup>[12]</sup>。不同来源的 TAs 合成产物的立体偏好性并不相同，动力学控制下产物的非对映异构体比例取决于每种异构体合成的能垒，而热力学控制下产物构型偏好性取决于热力学稳定性。一般来讲，处于动力学控制可获得较高的 de 值但转化率较低，处于热力学控制产物的转化率得到提高但 de 值显著下降。

很长一段时间，TAs 催化羟醛缩合反应都是以甘氨酸为供体，随着研究深入发现也能利用一些非天然供体。Fresko 等首次报道了 *Pseudomonas* sp. 来源的 D-low-TA 和 *A. jandaei* 来源的 L-allo-TA 能以丙氨酸做供体，生成 α-碳上有双取代的氨基酸衍生物<sup>[50]</sup>。以上述 2 个基因为探针，进一步基因挖掘获得了更多类似的 TAs，供体底物进一步扩展至丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、2-氨基丁酸、亮氨酸和缬氨酸等<sup>[16,50]</sup>。

近年来，详细研究了多个不同生物来源 TAs 的底物谱，涉及多种脂肪醛、芳香醛及杂环醛，普遍不能严格控制 β-碳立体选择性，导致产物的

表 1 详细研究催化性质和底物谱的 TAs

Table 1 TAs with detailed catalytic properties and substrate profiles

Enzymes	Organisms	GenBank No.	Activity (substrates)	References
L-low-TA	<i>Actinocorallia herbida</i>	ROO84520	2.4 U/mg (L-threonine)	[27]
L-allo-TA	<i>Aeromonas jandaei</i>	BAA20404	3.4 U/mg (L-allo-threonine)	[47]
L-TA	<i>Bacillus nealsonii</i>	WP_016204489	2.9 U/mg (L-threo-3-(4-(methylsulfonyl)-phenylserine))	[14, 48]
L-TA	<i>Escherichia coli</i>	NP_415391	3.5 U/mg (L-threonine)	[37]
L-TA	<i>Pseudomonas</i> sp.	WP_065760197	20 U/mg (L-threonine)	[45-46]
L-allo-TA	<i>Thermatoga maritime</i>	NP_229542	—	[49]
D-low-TA	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	BAA86032	8 U/mg (D-threonine)	[45-46]
D-low-TA	<i>Delftia</i> sp.	EZP46516	21.3 U/mg (D-threonine)	[36]
D-low-TA	<i>Xanthomonas oryzae</i>	—	153 U/mg (D-threonine)	[37]

de 值较低<sup>[51]</sup>。另一方面, 由于羟醛缩合反应可逆, 为了提高转化率, 通常需加入 8–10 当量供体底物来推动反应平衡朝向合成方向, 反应完成需要回收过量的供体底物<sup>[52]</sup>。较低的 de 值和转化率是 TAs 在进一步合成应用中所面临的巨大挑战。

## 4 苏氨酸醛缩酶的分子改造与合成应用

天然来源 TAs 合成  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸及其衍生物存在活性、稳定性和立体选择性等方面的不足, 尤其是不能高效构建产物的双手性中心<sup>[53–54]</sup>。一方面, 复杂的酶活中心微环境导致立体选择性控制机理不清晰, 使得理性设计和半理性设计掣肘; 另一方面, 羟醛缩合反应受限于动力学和热力学控制, 难以获得热力学平衡下的高立体选择性突变体。很多研究致力于通过定向进化、半理性设计等方式改造酶分子, 以期提高酶的催化性能。

### 4.1 高通量筛选方法

定向进化是酶分子改造的主要方式, 如何从大量突变体中筛选到有益突变体是定向进化的瓶颈, 合适的高通量筛选方法将突破这一局限。常见的筛选方法是以  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸 (尤其是苏氨酸) 为底物, 在 TAs 催化下裂解生成甘氨酸和醛, 通过偶联醇脱氢酶转化醛生成相应的醇, 在此过程中消耗 NADH, 引起 340 nm 吸光值的下降, 从而衡量 TAs 的裂解活性<sup>[55]</sup>。类似的方法有很多, 本质上来讲都是以醛为化学探针, 筛选裂解活性提升的突变体<sup>[56–57]</sup>。

Giger 等敲除宿主菌 *E. coli* MG1655 的丝氨酸羟甲基转移酶 *glyA*、苏氨酸醛缩酶 *ltaE* 和 2-氨基-3-丁酮酸裂解酶 *tdh-knl*, 构建甘氨酸营养缺陷型宿主, 以苏氨酸为底物筛选裂解活性高的 TAs, 但是该方法未能获得催化效率显著提高的突变体<sup>[30]</sup>。Bulut 等敲除 *ltaE* 基因构建宿主菌 *P. putida* KT2440 的筛选平台, 以 DL-*threo*-苯丝氨酸为唯一碳源筛选高裂解活性的 TAs, 该方法对 D-TA 没有效果, 只能针对 L-TA 进行活性筛选<sup>[58]</sup>。Lee 等

以过量乙醛为底物, 具有较高加成活性的突变体会快速消耗有毒底物, 从而被筛选出来, 该方法不仅能筛选突变体缩合的活性, 亦可筛选底物的耐受性<sup>[59]</sup>。

通常 TAs 在羟醛缩合和裂解反应中非对映异构体的比值是不同的, 上述方法主要是针对动力学控制下的裂解活性, 并未探究热力学控制下的缩合活性和立体选择性。根据定向进化筛选的原则 (First law of directed evolution—you get what you screen for), 直接检测所要合成的产物才是筛选的关键。基于此思路, 笔者开发了同时检测 TAs 缩合活性和立体选择性的分步可视化筛选方法<sup>[60]</sup>。将 L-TA 和 L-*threo*-苯丝氨酸脱水酶 (L-*threo*-PSDH) 相偶联, 通过检测醛底物残余量来推算 L- $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的总生成量, 从而衡量 L-TA 的缩合活性; 反应体系中再加入 L-*threo*-PSDH, 特异性催化 L-*threo* 产物生成相应酮酸, 通过检测酮酸生成量来推算 L-*threo* 产物的生成量, 进而得知 L-*erythro* 产物的生成量, 从而衡量 L-TA 的立体选择性 (图 5A)。Purpald 和  $\text{Fe}^{3+}$  检测苯甲醛和苯丙酮酸最佳检测波长分别是 540 nm 和 640 nm (图 5B), 检测上限可达 10 mmol/L (图 5C–D), 可实现在热力学控制下可视化检测 L-TAs 的缩合活性和立体选择性, 为高通量筛选 TAs 提供了一种新颖的普适性方法。

### 4.2 L-TA 的改造及合成应用

高效构建  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的双手性中心一直是 TAs 研究的难点和热点, 很多研究致力于新颖基因挖掘和分子改造来突破酶在热稳定性和立体选择性等方面的瓶颈。

酶的稳定性是衡量其应用价值的重要参数, *S. coelicolor* 来源的 L-low-TA 在 60 °C 处理 20 min 残余酶活仅有 10.6%, 随机突变获得 H177Y、A169T、D104N 和 F18I 突变体, 同样条件处理后其残余酶活分别达到了 85.7%、58.6%、62.1% 和 67.6%<sup>[57]</sup>。在两个亚基间引入盐桥或二硫键, 来

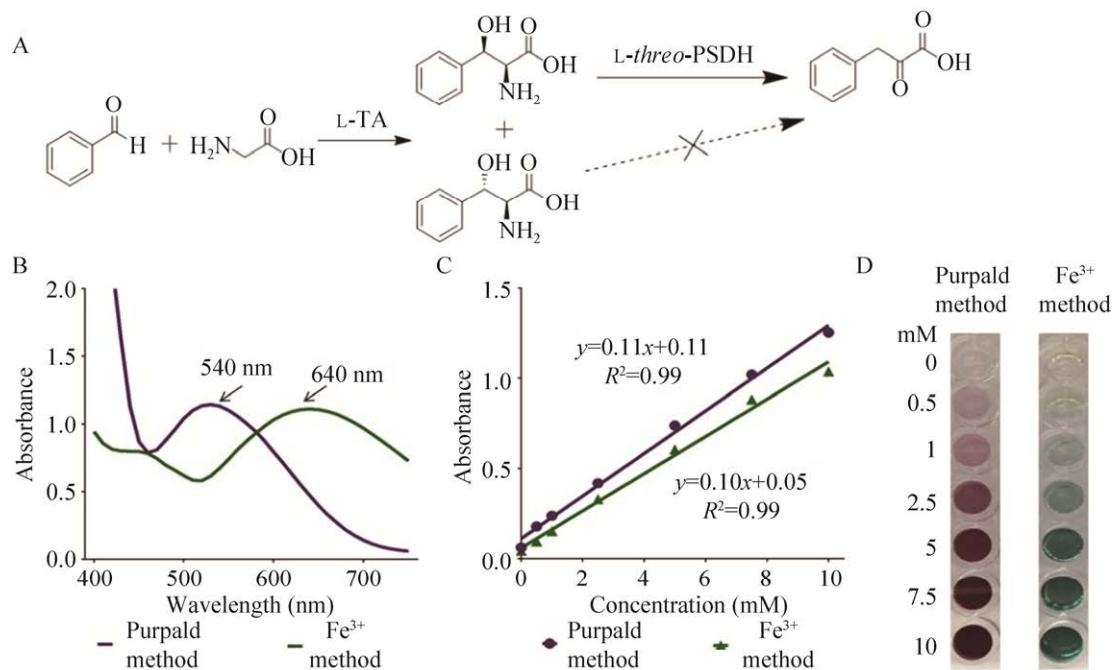


图5 L-TA 的缩合活性和立体选择性的筛选方法<sup>[60]</sup>

Fig. 5 Screening method for addition activity and stereoselectivity of L-TA<sup>[60]</sup>. (A) Principles of screening assay. (B) Multi-wavelength scanning. (C) Calibration curves. (D) Colorimetric assays at different concentrations.

提高 *T. maritime* 来源的 L-low-TA 的热稳定性, 突变体 P56C 在 80 °C 的热稳定性提高了 15%, 而突变体 W86E 对 L-苏氨酸的裂解活性有所提高, 但是在热稳定性上并没有改变, 作者推测来自嗜热菌的该酶可能在热稳定上已经自然进化得较好<sup>[61]</sup>。

*L-threo*-4-硝基苯丝氨酸是氯霉素中间体, 以 *E. coli* 来源的 L-low-TA 催化 0.5 mol/L 甘氨酸和 0.1 mol/L 4-硝基苯甲醛在 pH 8.0、45 °C 反应 24 h, 转化率为 43%, 分离得率为 35%, de 值约 33% (表 2)<sup>[62]</sup>。甲砒霉素和氟苯尼考是新型氯霉素类的

表 2 L-TAs 在高附加值 β-羟基-α-氨基酸中的合成应用

Table 2 Applications of L-TAs in synthesizing high-value β-hydroxy-α-amino acids

Organisms	WT or variant	Substrates (concentration)	Conversion	De value	References
<i>Escherichia coli</i>	WT	4-nitrobenzaldehyde (100 mmol/L)	43%	~33% ( <i>threo</i> )	[62]
<i>Actinocorallia herbida</i>	WT	4-methylsulfonylbenzaldehyde (500 mmol/L)	61%	77% ( <i>threo</i> )	[27]
<i>Pseudomonas</i> sp.	WT	4-methylsulfonylbenzaldehyde (100 mmol/L)	68%	53% ( <i>threo</i> )	[45]
<i>Pseudomonas</i> sp.	V200I	4-methylsulfonylbenzaldehyde (100 mmol/L)	57%	71% ( <i>threo</i> )	[63]
<i>Bacillus nealsonii</i>	Y31H/N305R	4-methylsulfonylbenzaldehyde (100 mmol/L)	87%	93% ( <i>threo</i> )	[48]
<i>Pseudomonas</i> sp.	D93H/E147D	2-chlorobenzaldehyde (100 mmol/L)	91%	71% ( <i>threo</i> )	[60]
<i>Pseudomonas</i> sp.	D93N/E147D	Benzaldehyde (100 mmol/L)	36%	74% ( <i>erythro</i> )	[60]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Y34C/Y39C/ Y306C/R316C	3,4-dihydroxybenzaldehyde (50 mmol/L)	41%	60% ( <i>threo</i> )	[64]



广谱抗菌药，其关键中间体 *L-threo*-4-甲磺基苯丝氨酸 (*L-threo*-MPS) 是酶促合成的重要目标化合物，表 2 中第 2–5 行总结了近年来 *L*-TAs 在合成 *L-threo*-MPS 中的应用。来源于草状珊瑚状放线菌 *Actinocorallia herbida* 的 *L*-low-TA 催化合成 *L-threo*-MPS 获得了 97% 的转化率，*de* 值仅有 19%。针对产物立体选择性优化反应条件，1 mL 反应体系 (100 mol/L PBS, pH 7.0) 含有 1 mol/L 甘氨酸，0.5 mol/L 4-甲磺基苯甲醛，50 mmol/L PLP，12.5 mg/mL 湿菌体和 30% 乙腈，在 30 °C 反应 6 h，产物 *de* 值提高到 61%，转化率为 77%<sup>[27]</sup>。*Pseudomonas sp.* 来源的 *L*-low-TA 在 1 mL 反应中合成 *L-threo*-MPS 的 *de* 值为 53%，但在 30 mL 制备级反应中 *de* 值显著下降到 2%<sup>[45]</sup>。该酶经过随机突变改造和分步可视化筛选，有益突变体 V200I 在相同体积的制备级反应中合成 *L-threo*-MPS，*de* 值可达 71%，显著提升了热力学控制下产物的立体选择性，同时反映出分步可视化筛选方法可有效筛选热力学控制下立体选择性提高的突变体<sup>[63]</sup>。

将 *L-threo*-MPS 和 *L-erythro*-MPS 与 PLP 相结合的配体分别对接到来源于尼氏芽孢杆菌 *Bacillus nealsonii* 的 *L*-low-TA 的酶活中心，PLP-Gly 醛亚胺中间体从 *si*-face 亲核进攻可以合成 *L-threo*-MPS，而从 *re*-face 进攻可合成 *L-erythro*-MPS。基于此，Zheng 等提出增强合成 *L-threo* 构型的同时阻断合成 *L-erythro* 构型的立体选择性改造策略 (图 6)<sup>[48]</sup>。突变体 Y31H 提高了 *L-threo* 产物的合成，N305R 减弱了 *L-erythro* 产物的合成，从而提高产物的 *de* 值。Y31H/N305R 在动力学控制下合成 *L-threo*-MPS，转化率和 *de* 值从野生型的 53% 和 30% 提高至 55% 和 83%。加入 25% *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-Dimethylformamide, DMF) 来提高底物溶解度，转化率提高至 87% 的同时 *de* 值也提升至 93% (表 2)，这可能是 DMF 的加入改变了酶活中心微环境，使得 N305R 突变位点的刚性增加。

为了提高 *L*-TA 的立体选择性，将与底物  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的氨基、羧基和羟基等官能团相互作用的氨基酸残基位点进行组合突变，以期通过各个官能团的同时有效绑定，来达到控制立体选择性的目的 (图 7)<sup>[60]</sup>。基于此思路，分子改造来源于 *Pseudomonas sp.* 的 *L*-low-TA，突变体 D93H/E147D 偏好生成 *L-threo* 构型产物，其中 *L-threo*-2-氯苯丝氨酸 *de* 值可达 71%；突变体 D93N/E147D 催化反转产物构型，*L-erythro*-苯丝氨酸的 *de* 值可达 74%，这是首次获得构型反转的突变体 (表 2)。分子对接表明，E147 突变成位阻较小的 Asp，有足够的空间与产物氨基相互作用，达到有效绑定。D93 突变成 His 或 Asn，产物苯环分别与 H133 或者 Y312 形成  $\pi$ - $\pi$  堆积作用或 CH- $\pi$  相互作用，缩短产物羟基与 H133 咪唑的距离，从而使产物偏好 *L-threo* 或 *L-erythro* 构型产物。突变与产物多个官能团同时相互作用的氨基酸位点，提升或反转产物立体选择性，为 TAs 的分子改造提供了一种新思路。

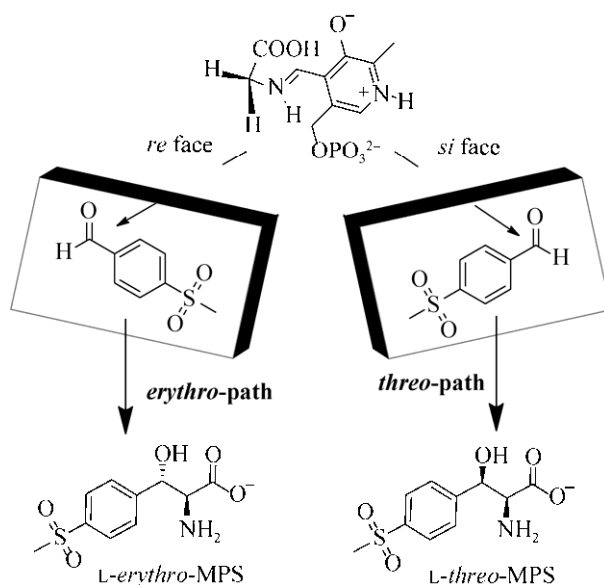


图 6 不同亲核进攻方向合成 *L*-MPS 异构体<sup>[48]</sup>

Fig. 6 Synthesis of *L*-MPS isomers from different nucleophilic offensive directions<sup>[48]</sup>.

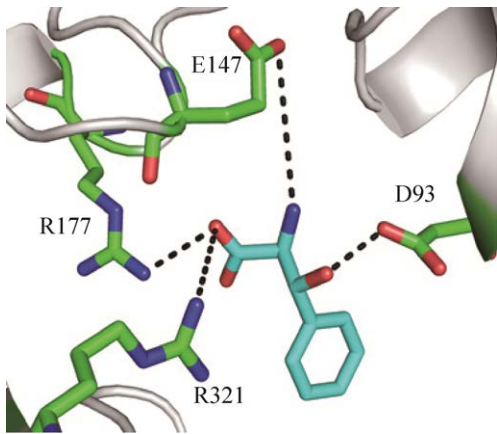


图 7 基于与底物不同官能团的相互作用的氨基酸选择方式

Fig. 7 Amino acid selection based on interactions with different functional groups of the substrate.

*L-threo*-3,4-二羟基苯丝氨酸 (*L-threo*-DOPS), 是治疗帕金森氏症的重要药物屈昔多巴, 来源于阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 的 *L-low*-TA 在反应器中整细胞催化合成 *L-threo*-DOPS, 反应 114 h 产物浓度达到 8 g/L, 没有报道 de 值<sup>[22]</sup>。随机突变 *S. coelicolor* 来源的 *L-low*-TA, 经过两轮筛选获得 45 000 余个突变体, 最优突变体 Y34C/Y39C/A48T/Y306C 催化合成 *L-threo*-DOPS, de 值从野生型的 14% 提高到 55%, 产物浓度为 3.8 g/L<sup>[65]</sup>。另一个突变体 Y34C/ Y39C/Y306C/R316C 在最优化反应 (pH 6.5, 10 °C, 0.75% TritonX-100) 反应 100 h, *L-threo*-DOPS 的 de 值

为 60%, 产物浓度为 4 g/L (表 2)<sup>[64]</sup>。

一些结构复杂药物的中间体也尝试采用 *L*-TA 构建 *L*-β-羟基-α-氨基酸手性砌块。2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醛<sup>[66]</sup>或 2,2-二甲基-5-乙烯基-[1,3]-二氧戊环-4-甲醛为醛底物<sup>[67-68]</sup>, 在 *L*-TA 催化下合成 3,4-二羟基脯氨酸或多氧菌素的中间体。不对称合成 α-氨基-β-羟基-γ-丁内酯<sup>[69]</sup>, (3*R*,5*R*)-二羟基-*L*-高脯氨酸<sup>[70]</sup>也见诸报道。

最近研究发现共表达 *L*-TA 与 *B. subtilis* 来源的 PLP 合酶, 可显著提高内源性 PLP 生成量, 相比于野生型酶活 254.1 U/L, 不添加外源 PLP 的共表达菌株的酶活能提高到 1 518.4 U/L, 实现 PLP 的自给自足<sup>[14]</sup>。

为了克服羟醛缩合反应处在动力学和热力学的限制, 将 *L*-TA 与来源于粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 的 *L*-酪氨酸脱羧酶 (*L*-TyrDC) 相偶联, 利用 *L*-TyrDC 对 *L-threo* 和 *L-erythro* 产物之间的活性差异, 延长反应时间以实现动态动力学不对称转化合成 (*R*)-2-氨基-1-苯甲醇 (图 8A)<sup>[71]</sup>。偶联来源于谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 的苏氨酸脱氨酶 (TD), 将 β-羟基-α-氨基酸降解成酮酸, 再偶联转氨酶或脱氢酶, 进而合成手性 α-羟基酸或 α-氨基酸 (图 8B)<sup>[72]</sup>。上述多酶级联反应只是利用 *L*-TA 构建 C-C 键, 合成的 β-羟基-α-氨基酸作为中间产物被后续反应进一步分解, 并没有解决 *L*-TA 的 β-碳立体选择性问题。

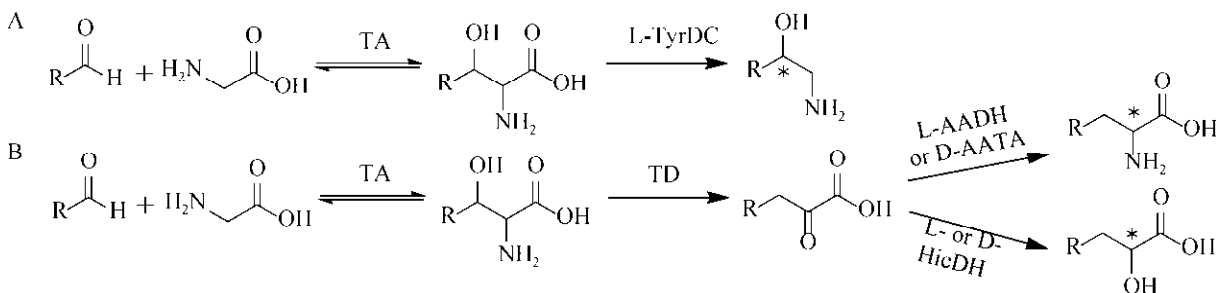


图 8 *L*-TA 参与的多酶级联反应

Fig. 8 Multi-enzyme cascade reaction involving *L*-TA. (A) Synthesis of amino alcohol by dual-enzyme coupled reaction. (B) Synthesis of α-hydroxy acid or α-amino acid by multi-enzyme cascade reaction.

### 4.3 D-TA 的合成应用

与 L-TA 类似, D-TA 催化反应同样受限于动力学和热力学产物达到平衡,不同的是, D-TA 在动力学控制下时间较长<sup>[12]</sup>。根据这一特性,笔者通过降低反应温度和减少酶量等优化方式,减缓羟醛缩合反应速率从而改善来源于代尔夫特菌 *Delftia* sp. 的 D-low-TA 的  $\beta$ -碳立体选择性,对于特定底物在高转化率下获得高 de 值,如 D-threo-2-氟苯丝氨酸(转化率为 92.8%, de 值为 97.8%), D-threo-3-硝基苯丝氨酸(转化率为 92.2%, de 值为 93.2%)<sup>[36]</sup>。

D-threo-2-氨基-3-羟基-3-(4-吡啶基)丙酸是药物活性成分  $\beta$ -羟氨基酰胺酒石酸盐的关键中间体, *A. xylooxidans* 来源的 D-low-TA 催化 4-吡啶甲醛和甘氨酸,一步引入双手性中心的同时,可严格控制产物立体选择性 (de>99%) (图 9)<sup>[73-74]</sup>。由于反应体系的 pH 值接近产物等电点,产物以结晶沉淀形式推动反应平衡,提高转化率,极大地简化了分离和纯化。这是目前应用 TAs 合成  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸的经典案例<sup>[75]</sup>。

*A. xylooxidans* 来源的 D-low-TA 仅能高效构建特定产物的双手性中心,定向进化改造获得突变体 D321C 和 N101G,对 4-甲磺基苯甲醛的活性是野生型的 1.5 倍和 1.3 倍,反应 6 h 转化率能

达到 36.7%和 31.9%,相比野生型提高了 13.9%和 9.1%,且对苯甲醛、4-氯苯甲醛、4-羟基苯甲醛等活性也有所提高,但未提及产物的构型和 de 值<sup>[56]</sup>。

较为苛刻的条件使得 D-low-TA 在不对称合成中难以广泛应用,更多的是利用其拆分消旋体制备光学纯 L- $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸。*A. xylooxidans* 来源的 D-low-TA 的纯酶液可完全拆分 0.6 mol/L 的 DL-threo-DOPS,获得产物 L-threo-DOPS 的对映体过量 (Enantiomeric excess, ee 值) >99%<sup>[34]</sup>。来源于节杆菌属 *Arthrobacter* sp. 的 D-low-TA 整细胞催化可完全拆分 0.2 mol/L 的 L-threo-4-甲磺基苯丝氨酸 (L-threo-MTPS) 获得接近 50% 的收率和 >99% 的 ee 值,副产物 4-甲磺基苯甲醛和甘氨酸可回收作为原材料 (图 10)<sup>[76]</sup>。

在动力学拆分中,底物  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸在水相中溶解性较好,产物芳香醛在有机相中溶解性较好,基于此,为了提高底物浓度并推动平衡反应朝向裂解方向,笔者构建了双相体系下整细胞的拆分反应<sup>[36]</sup>。50% (V/V) 的 1,2-二氯乙烷做有机溶剂,0.08 g/mL 的 *Delftia* sp. 来源的 D-low-TA 湿菌体,反应 9 h 可完全拆分 1.0 mol/L 的 DL-threo-苯丝氨酸或 0.3 mol/L 的 DL-threo-MPS,产物 ee 值 >99%,这是目前底物浓度最高的拆分反应。

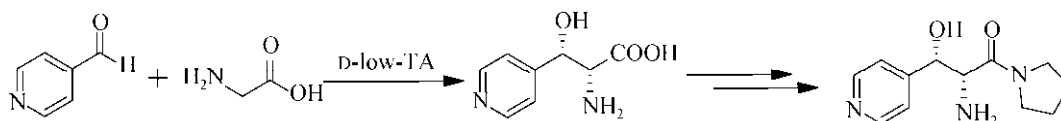


图 9 D-low-TA 催化合成药物活性成分中间体<sup>[73]</sup>

Fig. 9 Synthesis of active pharmaceutical ingredient intermediates using D-low-TA<sup>[73]</sup>.

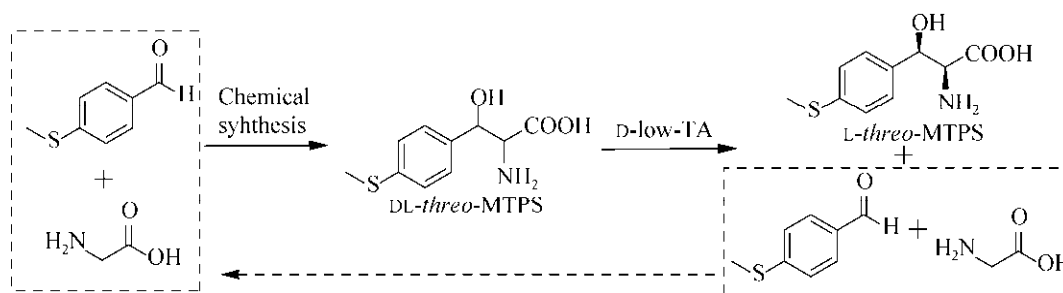


图 10 酶-化学法生产 L-threo-MTPS<sup>[76]</sup>

Fig. 10 A chemo-enzymatic process proposed for production of L-threo-MTPS<sup>[76]</sup>.

Seebeck 等获得来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌的 *Geobacillus stearothermophilus* 的丙氨酸消旋酶突变体 Y265A, 具有 D-TA 的羟醛缩合活性, 可合成 D- $\beta$ -苯丝氨酸和 D- $\alpha$ -甲基- $\beta$ -苯丝氨酸<sup>[77-78]</sup>。分子改造获得突变体 Y265K/I352W 和 Y265K/I352W/M134F, 相比于 Y265A 对 D-*threo* 和 D-*erythro*-苯丝氨酸的催化效率分别提高了 4.7 倍和 31.5 倍<sup>[79]</sup>。

## 5 总结与展望

光学纯  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸是非常重要的手性砌块, 广泛应用于医药、精细化工品等领域, TAs 催化非手性甘氨酸和醛, 一步构建双手性中心, 在原子经济性和环保方面都有很大优势。已报道的 TAs 底物谱较广, 能催化多种脂肪醛、芳香醛及杂环醛底物, 但受限于动力学和热力学的平衡, 产物立体选择性普遍较低, 不同来源的 L-TA 合成  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸均没有获得光学纯产物, D-TA 仅可严格控制特定底物立体选择性。已报道多种分子改造酶立体选择性的有益尝试, 但产物  $\beta$ -碳的新分子改造策略仍需进一步探索, 如基于人工神经网络算法的机器学习指导酶定向进化、酶生物信息学与分子模拟相结合的基因组挖掘以及对特定底物的酶从头设计等。鉴于 TAs 存在催化性能等不足, 可以预期会在酶催化机理、分子改造等方面开展以下几个方面的研究: 在自然界中筛选对不同结构特征醛底物具有立体选择性的新颖 TAs, 开展酶学性质和催化性质研究; 解析天然 TAs 及其具有立体选择性突变体与底物 (或底物类似物) 和辅因子 PLP 结合的共结晶结构, 从分子水平理解底物识别和立体选择性控制的催化反应机理; 通过分子改造解决 TAs 催化反应  $\beta$ -碳立体选择性不高的难题, 获得可催化不同结构特征醛底物不对称合成  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸, 实现光学纯产物的高效、绿色制备; 设计构建新颖多酶级联体系, 从廉价的非手性化合物高效合成光学纯  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸。在此基础上, 以催化性能优良的 TAs 酶及突变体为催化剂, 构建绿色生物催化

生产工艺, 将成为高附加  $\beta$ -羟基- $\alpha$ -氨基酸手性砌块合成的关键技术。

## REFERENCES

- [1] Zhang YF, Farrants H, Li XC. Adding a functional handle to nature's building blocks: the asymmetric synthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids. *Chem Asian J*, 2014, 9(7): 1752-1764.
- [2] Lu B, Wu XY, Li CY, et al. Highly diastereo- and enantioselective access to *syn*- $\alpha$ -amido  $\beta$ -hydroxy esters *via* Ruthenium-catalyzed dynamic kinetic resolution-asymmetric hydrogenation. *J Org Chem*, 2019, 84(6): 3201-3213.
- [3] Guan YQ, Gao M, Deng X, et al. Rhodium-catalyzed asymmetric hydrogenation of tetrasubstituted  $\beta$ -acetoxo- $\alpha$ -enamido esters and efficient synthesis of droxidopa. *Chem Commun*, 2017, 53(58): 8136-8139.
- [4] Jung ME, Jung YH. Rapid synthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids, such as L-threonine,  $\beta$ -hydroxyphenylalanine, and  $\beta$ -hydroxyleucine, *via* an application of the sharpless asymmetric epoxidation. *Tetrahedron Lett*, 1989, 30(48): 6637-6640.
- [5] Fanning KN, Jamieson AG, Sutherland A. Stereoselective  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid synthesis *via* an ether-directed, palladium-catalysed aza-Claisen rearrangement. *Org Biomol Chem*, 2005, 3(20): 3749-3756.
- [6] Almhjell PJ, Boville CE, Arnold FH. Engineering enzymes for noncanonical amino acid synthesis. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(24): 8980-8997.
- [7] Clapés P, Garrabou X. Current trends in asymmetric synthesis with aldolases. *Adv Synth Catal*, 2011, 353(13): 2263-2283.
- [8] 黎军, 张志雄, 杨金亮, 等. 苏氨酸醛缩酶的研究进展. *生物技术通讯*, 2019, 30(3): 442-448.  
Li J, Zhang ZX, Yang JL, et al. Research progress of threonine aldolases. *Lett Biotechnol*, 2019, 30(3): 442-448 (in Chinese).
- [9] Fesko K. Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(6): 2579-2590.

- [10] Dückers N, Baer K, Simon S, et al. Threonine aldolases-screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(2): 409-424.
- [11] Misono H, Maeda H, Tuda K, et al. Characterization of an inducible phenylserine aldolase from *Pseudomonas putida* 24-1. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(8): 4602-4609.
- [12] Fesko K, Reisinger C, Steinreiber J, et al. Four types of threonine aldolases: similarities and differences in kinetics/thermodynamics. *J Mol Catal B: Enzym*, 2008, 52/53: 19-26.
- [13] Liu JQ, Dairi T, Itoh N, et al. Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, 10(1/2/3): 107-115.
- [14] Zheng W, Chen K, Fang S, et al. Construction and application of PLP self-sufficient biocatalysis system for threonine aldolase. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 141: 109667.
- [15] Stöcklein W, Schmidt HL. Evidence for L-threonine cleavage and allothreonine formation by different enzymes from *Clostridium pasteurianum*: threonine aldolase and serine hydroxymethyltransferase. *Biochem J*, 1985, 232(2): 621-622.
- [16] Fesko K, Strohmeier GA, Breinbauer R. Expanding the threonine aldolase toolbox for the asymmetric synthesis of tertiary  $\alpha$ -amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(22): 9651-9661.
- [17] 韦平和, 吴滔, 吴梧桐, 等. 低特异性 L-苏氨酸醛缩酶基因工程菌的构建. *药物生物技术*, 2000, 7(2): 86-89.  
Wei PH, Wu T, Wu WT, et al. Construction of low-specificity L-threonine aldolase genetic engineered strain. *Pharm Biotechnol*, 2000, 7(2): 86-89 (in Chinese).
- [18] Liu JQ, Dairi T, Itoh N, et al. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1998, 255(1): 220-226.
- [19] Liu JQ, Ito S, Dairi T, et al. Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 10558. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 549-554.
- [20] Liu JQ, Ito S, Dairi T, et al. Low-specificity L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558: purification, characterization and its application to  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(6): 702-708.
- [21] Herbert RB, Wilkinson B, Ellames GJ, et al. Stereospecific lysis of a range of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids catalysed by a novel aldolase from *Streptomyces amakusaensis*. *J Chem Soc Chem Commun*, 1993(2): 205-206.
- [22] Baik SH, Yoshioka H. Enhanced synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine by high-density whole-cell biocatalyst of recombinant L-threonine aldolase from *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(3): 443-448.
- [23] Ligibel M, Moore C, Bruccoleri R, et al. Identification and application of threonine aldolase for synthesis of valuable  $\alpha$ -amino,  $\beta$ -hydroxy-building blocks. *Biochim et Biophys Acta BBA - Proteins Proteom*, 2020, 1868(2): 140323.
- [24] Liu JQ, Dairi T, Kataoka M, et al. L-allo-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39: gene cloning, nucleotide sequencing, and identification of the pyridoxal 5'-phosphate-binding lysine residue by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*, 1997, 179(11): 3555-3560.
- [25] Wada M, Sakamoto M, Kataoka M, et al. Distribution of threonine aldolase activity with different stereospecificities in aerobic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(8): 1586-1588.
- [26] Kielkopf CL, Burley SK. X-ray structures of threonine aldolase complexes: structural basis of substrate recognition. *Biochemistry*, 2002, 41(39): 11711-11720.
- [27] Wang LC, Xu L, Xu XQ, et al. An L-threonine aldolase for asymmetric synthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids. *Chem Eng Sci*, 2020, 226: 115812.
- [28] McNeil JB, Flynn J, Tsao N, et al. Glycine metabolism in *Candida albicans*: characterization of the serine hydroxymethyltransferase (SHM1, SHM2) and threonine aldolase (GLY1) genes. *Yeast*, 2000, 16(2): 167-175.
- [29] Shibata K, Shingu K, Vassiley VP, et al. Kinetic and

- thermodynamic control of L-threonine aldolase catalyzed reaction and its application to the synthesis of mycestericin D. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37(16): 2791-2794.
- [30] Giger L, Toscano MD, Bouzon M, et al. A novel genetic selection system for PLP-dependent threonine aldolases. *Tetrahedron*, 2012, 68(37): 7549-7557.
- [31] 李利宏, 张荣珍, 周丽仙, 等. *Pseudomonas putida* KT2440 低特异性 L-苏氨酸醛缩酶的表达、酶学性质及温度稳定性提高. *微生物学报*, 2019, 59(10): 2013-2023.
- Li LH, Zhang RZ, Zhou LX, et al. Expression, characterization and thermostability improvement of low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas putida* KT2440. *Acta Microbiol Sin*, 2019, 59(10): 2013-2023 (in Chinese).
- [32] Liu JQ, Nagata S, Dairi T, et al. The GLY1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-*allo*-threonine and L-threonine to glycine. Expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. *Eur J Biochem*, 1997, 245(2): 289-293.
- [33] Liu JQ, Dairi T, Itoh N, et al. A novel metal-activated pyridoxal enzyme with a unique primary structure, low specificity D-threonine aldolase from *Arthrobacter* sp. strain DK-38: molecular cloning and cofactor characterization. *J Biol Chem*, 1998, 273(27): 16678-16685.
- [34] Liu JQ, Odani M, Yasuoka T, et al. Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* and its application for production of a key intermediate for Parkinsonism drug. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54(1): 44-51.
- [35] Hirato Y, Tokuhisa M, Tanigawa M, et al. Cloning and characterization of D-threonine aldolase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*, 2017, 135: 18-23.
- [36] Chen QJ, Chen X, Cui YF, et al. A new D-threonine aldolase as a promising biocatalyst for highly stereoselective preparation of chiral aromatic  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids. *Catal Sci Technol*, 2017, 7(24): 5964-5973.
- [37] Kimura T, Vassilev VP, Shen GJ, et al. Enzymatic synthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids based on recombinant D- and L-threonine aldolases. *J Am Chem Soc*, 1997, 119(49): 11734-11742.
- [38] Paiardini A, Contestabile R, D'Aguzzo S, et al. Threonine aldolase and alanine racemase: novel examples of convergent evolution in the superfamily of vitamin B<sub>6</sub>-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1647(1/2): 214-219.
- [39] Liu G, Zhang M, Chen X, et al. Evolution of threonine aldolases, a diverse family involved in the second pathway of glycine biosynthesis. *J Mol Evol*, 2015, 80(2): 102-107.
- [40] di Salvo ML, Remesh SG, Vivoli M, et al. On the catalytic mechanism and stereospecificity of *Escherichia coli* L-threonine aldolase. *FEBS J*, 2014, 281(1): 129-145.
- [41] Remesh SG, Ghatge MS, Ahmed MH, et al. Molecular basis of *E. coli* L-threonine aldolase catalytic inactivation at low pH. *Biochim et Biophys Acta BBA-Proteins Proteom*, 2015, 1854(4): 278-283.
- [42] Qin HM, Imai FL, Miyakawa T, et al. L-*allo*-threonine aldolase with an H128Y/S292R mutation from *Aeromonas jandaei* DK-39 reveals the structural basis of changes in substrate stereoselectivity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(pt 6): 1695-1703.
- [43] Uhl MK, Oberdorfer G, Steinkellner G, et al. The crystal structure of D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* provides insight into a metal ion assisted PLP-dependent mechanism. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0124056.
- [44] Hirato Y, Goto M, Tokuhisa M, et al. Crystallization and X-ray analysis of D-threonine aldolase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*, 2017, 73(Pt 2): 86-89.
- [45] Steinreiber J, Fesko K, Reisinger C, et al. Threonine aldolases — an emerging tool for organic synthesis. *Tetrahedron*, 2007, 63(4): 918-926.
- [46] Steinreiber J, Fesko K, Mayer C, et al. Synthesis of  $\gamma$ -halogenated and long-chain  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids and 2-amino-1,3-diols using threonine aldolases. *Tetrahedron*, 2007, 63(34): 8088-8093.
- [47] Kataoka M, Wada M, Nishi K, et al. Purification and characterization of L-*allo*-threonine aldolase from

- Aeromonas jandaei* DK-39. FEMS Microbiol Lett, 1997, 151(2): 245-248.
- [48] Zheng W, Chen K, Wang Z, et al. Construction of a highly diastereoselective aldol reaction system with L-threonine aldolase by computer-assisted rational molecular modification and medium engineering. Org Lett, 2020, 22(15): 5763-5767.
- [49] Beaudoin SF, Hanna MP, Ghiviriga I, et al. Progress in using threonine aldolases for preparative synthesis. Enzyme Microb Technol, 2018, 119: 1-9.
- [50] Fesko K, Uhl M, Steinreiber J, et al. Biocatalytic access to  $\alpha,\alpha$ -dialkyl- $\alpha$ -amino acids by a mechanism-based approach. Angewandte Chemie Int Ed, 2010, 49(1): 121-124.
- [51] Franz SE, Stewart JD. Threonine aldolases. Advances in applied microbiology. Amsterdam: Elsevier, 2014: 57-101.
- [52] Baer K, Dücker N, Rosenbaum T, et al. A study towards efficient L-threonine aldolase-catalyzed enantio- and diastereoselective aldol reactions of glycine with substituted benzaldehydes: biocatalyst production and process development. Tetrahedron: Asymmetry, 2011, 22(9): 925-928.
- [53] Fesko K. Comparison of L-threonine aldolase variants in the aldol and retro-aldol reactions. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 119.
- [54] Fesko K, Suplatov D, Švedas V. Bioinformatic analysis of the fold type I PLP-dependent enzymes reveals determinants of reaction specificity in L-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei*. FEBS Open Bio, 2018, 8(6): 1013-1028.
- [55] Liu YF, Li FR, Zhang XR, et al. A fast and sensitive coupled enzyme assay for the measurement of L-threonine and application to high-throughput screening of threonine-overproducing strains. Enzyme Microb Technol, 2014, 67: 1-7.
- [56] Gong L, Xu GC, Cao XD, et al. High-throughput screening method for directed evolution and characterization of aldol activity of D-threonine aldolase. Appl Biochem Biotechnol, 2021, 193(2): 417-429.
- [57] Balk SH, Yoshioka H, Yukawa H, et al. Synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) with thermostabilized low-specific L-threonine aldolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(5): 721-727.
- [58] Bulut D, Gröger H, Hummel W. Development of a growth-dependent selection system for identification of L-threonine aldolases. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(14): 5875-5883.
- [59] Lee SJ, Kang HY, Lee Y. High-throughput screening methods for selecting L-threonine aldolases with improved activity. J Mol Catal B: Enzym, 2003, 26(3/4/5/6): 265-272.
- [60] Chen QJ, Chen X, Feng JH, et al. Improving and inverting C $\beta$ -stereoselectivity of threonine aldolase via substrate-binding-guided mutagenesis and a stepwise visual screening. ACS Catal, 2019, 9(5): 4462-4469.
- [61] Wieteska L, Ionov M, Szemraj J, et al. Improving thermal stability of thermophilic L-threonine aldolase from *Thermotoga maritima*. J Biotechnol, 2015, 199: 69-76.
- [62] 余进海, 吴婷, 刘均忠, 等. L-苏氨酸醛缩酶催化合成 L-4-硝基苯基丝氨酸. 精细化工, 2018, 35(12): 2039-2044,2064.
- Yu JH, Wu T, Liu JZ, et al. Synthesis of 4-nitrophenylserine by whole cell with recombinant L-threonine aldolase. Fine Chem, 2018, 35(12): 2039-2044,2064 (in Chinese).
- [63] Liu ZC, Chen X, Chen QJ, et al. Engineering of L-threonine aldolase for the preparation of 4-(methylsulfonyl)phenylserine, an important intermediate for the synthesis of florfenicol and thiamphenicol. Enzyme Microb Technol, 2020, 137: 109551.
- [64] Gwon HJ, Baik SH. Diastereoselective synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine by low-specific L-threonine aldolase mutants. Biotechnol Lett, 2010, 32(1): 143-149.
- [65] Gwon HJ, Yoshioka H, Song NE, et al. Optimal production of L-threo-2,3-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) on a large scale by diastereoselectivity-enhanced variant of L-threonine aldolase expressed in *Escherichia coli*. Prep Biochem Biotechnol, 2012, 42(2): 143-154.
- [66] Fujii M, Miura T, Kajimoto T, et al. Facile synthesis of 3,4-dihydroxyprolines as an application of the L-threonine aldolase-catalyzed aldol reaction. Synlett, 2000, 2000(7): 1046-1048.

- [67] Nishiyama T, Kajimoto T, Mohile SS, et al. The first enantioselective synthesis of imino-deoxydigitoxose and protected imino-digitoxose by using L-threonine aldolase-catalyzed aldol condensation. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20(2): 230-234.
- [68] Kajimoto T, Nishiyama T, Surendra Mohile S, et al. Synthesis of thymine polyoxin C by using L-threonine aldolase-catalyzed aldol reaction. *Heterocycles*, 2007, 71(6): 1397.
- [69] Vassilev VP, Uchiyama T, Kajimoto T, et al. An efficient chemo-enzymatic synthesis of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone. *Tetrahedron Lett*, 1995, 36(28): 5063-5064.
- [70] Miura T, Kajimoto T. Application of L-threonine aldolase-catalyzed reaction to the preparation of protected 3R, 5R-dihydroxy-L-homoproline as a mimetic of idulonic acid. *Chirality*, 2001, 13(9): 577-580.
- [71] Steinreiber J, Schürmann M, Wolberg M, et al. Overcoming thermodynamic and kinetic limitations of aldolase-catalyzed reactions by applying multienzymatic dynamic kinetic asymmetric transformations. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46(10): 1624-1626.
- [72] Song W, Wang JH, Wu J, et al. Asymmetric assembly of high-value  $\alpha$ -functionalized organic acids using a biocatalytic chiral-group-resetting process. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1-9.
- [73] Schmidt MA, Reiff EA, Qian XH, et al. Development of a two-step, enantioselective synthesis of an amino alcohol drug candidate. *Org Process Res Dev*, 2015, 19(9): 1317-1322.
- [74] Goldberg SL, Goswami A, Guo ZW, et al. Preparation of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid using recombinant D-threonine aldolase. *Org Process Res Dev*, 2015, 19(9): 1308-1316.
- [75] Eastgate MD, Schmidt MA, Fandrick KR. On the design of complex drug candidate syntheses in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Chem*, 2017, 1(2): 1-16.
- [76] Liu JQ, Odani M, Dairi T, et al. A new route to L-threo-3-[4-(methylthio)phenylserine], a key intermediate for the synthesis of antibiotics: recombinant low-specificity D-threonine aldolase-catalyzed stereospecific resolution. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51(5): 586-591.
- [77] Seebeck FP, Guainazzi A, Amoreira C, et al. Stereoselectivity and expanded substrate scope of an engineered PLP-dependent aldolase. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(41): 6824-6826.
- [78] Seebeck FP, Hilvert D. Conversion of a PLP-dependent racemase into an aldolase by a single active site mutation. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(34): 10158-10159.
- [79] Toscano M, Müller M, Hilvert D. Enhancing activity and controlling stereoselectivity in a designed PLP-dependent aldolase. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46(24): 4468-4470.

(本文责编 陈宏宇)