

酶法生产 L-高苯丙氨酸的研究进展

高登科^{1,3}, 宋伟², 魏婉清¹, 黄康平², 吴静², 刘立明^{1,3*}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

高登科, 宋伟, 魏婉清, 黄康平, 吴静, 刘立明. 酶法生产 L-高苯丙氨酸的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3111-3124.
GAO Dengke, SONG Wei, WEI Wanqing, HUANG Kangping, WU Jing, LIU Liming. Advances in enzymatic production of L-homophenylalanine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3111-3124.

摘要: L-高苯丙氨酸(L-homophenylalanine, L-HPA)作为一种重要的非天然氨基酸,是合成治疗高血压的普利类药物等的关键中间体,具有广阔的市场前景。目前 L-高苯丙氨酸的合成主要依赖于化学法,但化学合成 L-高苯丙氨酸具有原料昂贵、步骤繁琐和污染严重等缺点,限制了广泛应用。因此,国内外研究者对 L-高苯丙氨酸的酶法生产进行了深入的研究。本文就目前酶法合成 L-高苯丙氨酸的工艺,包括脱氢酶法、转氨酶法、海因酶法和脱羧酶法的研究进展进行了综述,为酶法合成 L-高苯丙氨酸提供一定的借鉴,为最终实现 L-高苯丙氨酸的酶法工业化生产奠定基础。

关键词: L-高苯丙氨酸; 生物催化; 多酶级联; 普利类药物

Advances in enzymatic production of L-homophenylalanine

GAO Dengke^{1,3}, SONG Wei², WEI Wanqing¹, HUANG Kangping², WU Jing², LIU Liming^{1,3*}

1 State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-homophenylalanine (L-HPA) is an important non-natural amino acid that has been used as a key intermediate for the synthesis of Puli drugs for the treatment of hypertension. At present, L-HPA is synthesized using chemical methods, which has the disadvantages of expensive raw materials, tedious steps and serious pollution. Therefore, researchers have conducted in-depth research on the enzymatic production of L-HPA. This review summarizes the research progress on

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102700); 国家自然科学基金(22178146); 国家特支计划青年拔尖人才

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102700), the National Natural Science Foundation of China (22178146), and the Top Young Talents of the National Special Support Plan.

*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-01-24; Accepted: 2023-04-04

the enzymatic synthesis of L-HPA, including the dehydrogenase process, the transaminase process, the hydantoinase process, and the decarboxylase process, with the hope to facilitate the industrial production of L-HPA.

Keywords: L-homophenylalanine; biocatalysis; multienzyme cascade; Puli drugs

作为一种重要医药中间体, L-高苯丙氨酸(L-homophenylalanine, L-HPA)可合成 20 余种普利类降压药, 如依那普利、贝那普利、赖若普利和卡托普利等^[1]。随着高血压患者群体的扩大^[2], 使血管紧张素转换酶抑制剂药物市场具有明显增长的势头。L-HPA 同时还是合成治疗细菌感染的 β -内酰胺类抗生素药物、治疗心血管疾病的中性内肽酶抑制剂药物和治疗阿尔茨

海默病、路易体痴呆症的乙酰胆碱酯酶抑制剂药物(图 1)的中间体, 具有广泛的市场前景。

鉴于 L-HPA 的市场价值, 在过去的 30 年间, 研究人员建立了 L-HPA 包括化学合成法和生物酶法在内的多条工艺路线。化学合成工艺主要包括: (1) 目前工业上主要以 N-苯酰基-L-天冬氨酸酐为原料, 经傅克反应、氢化反应和脱保护等步骤合成 L-HPA, 收率为 82%, 但此方法

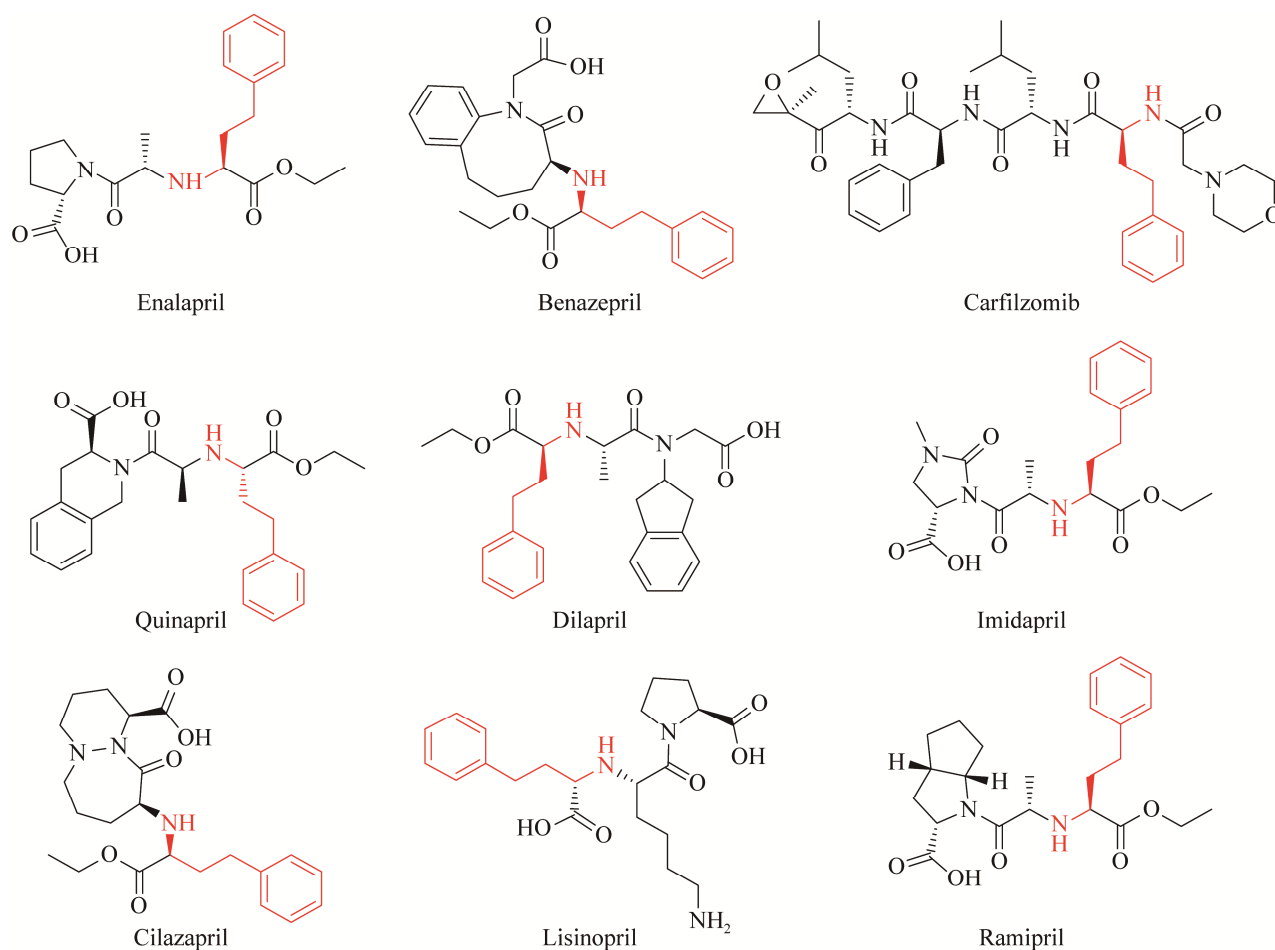


图 1 L-高苯丙氨酸作为重要的合成砌块可以合成的手性药物

Figure 1 Chiral drugs that can be synthesized by L-HPA as an important building block.

需要保护脱保护等步骤,成本较高^[3]。(2)以 N-保护的-L-天冬氨酸酯为原料,通过苄基化、脱羧、脱保护等步骤合成 L-HPA,收率仅为 13%^[4]。(3)以 1-氯-3-苯基丙烷为原料,经氰化等步骤合成 L-HPA,收率为 75%^[5]。(4)以苯乙酮和草酸二乙酯为原料,通过缩合、氨化和氢化等步骤合成 L-HPA,收率达到 87%以上^[6]。方法(2)、(3)、(4)具有得率不高、繁琐的保护脱保护步骤、反应条件难以控制和需要使用有毒试剂等缺陷,导致局限于实验室水平,难以进行工业化生产。另外,化学合成过程中能源浪费大,对环境污染严重,不符合国家低碳发展战略。与化学合成工艺相比,生物酶法具有反应条件温和、易在水环境中反应、污染小、能耗低和立体选择性高等优点,已经逐渐成为 L-HPA 的高效合成方法^[7-10]。

本文系统总结了国内外酶法合成 L-高苯丙氨酸的工艺过程,包括脱氢酶法、转氨酶法、海因酶法和脱羧酶法等;并比较了目前酶法合成 L-HPA 的技术路线、酶元件、生产工艺的优缺点等,为实现 L-高苯丙氨酸的工业化生产奠定了坚实的基础。

1 转氨酶法合成 L-高苯丙氨酸

转氨酶,又称氨基转移酶,广泛应用于大规模制备天然和非天然氨基酸的工艺中,这是因为转氨酶具有催化效率高、底物范围广、对映体选择性高等优点^[11-12]。转氨酶法合成 L-高苯丙氨酸是利用芳香族氨基酸转氨酶(EC 2.6.1.5)、天冬氨酸转氨酶(EC 2.6.1.1)、酪氨酸转氨酶(EC 2.6.1.5)等作为催化剂,以天然氨基酸作为氨基供体将底物 2-氧代-4-苯基丁酸(2-oxo-4-phenylbutanoic acid, OPBA)通过转氨反应合成 L-高苯丙氨酸(图 2A)。此类反应需要

磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)作为辅因子,但 PLP 一般不需要外源添加。

1.1 酶元件 L-氨基酸转氨酶的结构与机制

根据转移氨基的位置,转氨酶大致可分为 α -转氨酶(催化在 α -碳上的氨基转移)和 ω -转氨酶(反应中转移的氨基位置远离羧基部分)^[13],能催化合成 L-HPA 的转氨酶属于 α -转氨酶,以天冬氨酸转氨酶为例,探讨转氨酶结构及机制。天冬氨酸转氨酶的晶体结构已经非常清晰(图 2B),为二聚体结构,每个亚基由 2 个结构域组成:一个小结构域(残基 1-48 和 326-396)和一个大的 PLP 结合结构域^[17-18]。

转氨酶催化机理为乒乓反应机制,由 2 个连续的半反应组成(图 2C)。首先,辅因子 PLP 进入活性中心,与赖氨酸残基的氨基形成酶-PLP 席夫碱结构,也被称为内部醛亚胺。底物氨基酸上的氨基亲核进攻席夫碱,形成外部醛亚胺。随后从外部醛亚胺中去除 α 质子,形成碳负离子,然后赖氨酸的氨基的质子转移到辅因子的 C4 原子上,形成酮亚胺,酮亚胺中的亚胺碳原子被孤对电子亲核进攻,席夫碱共价键断裂,辅因子以磷酸吡哆胺的形式释放酮酸产物,后半反应以相反的顺序通过相同的中间体化合物严格进行,形成新的氨基酸并将辅因子再生成最初的 PLP 形式^[13-14]。基于催化机制,如需酮酸高效转化为氨基酸,则需要过量的氨基供体,才能促进反应向氨基酸生成方向进行。

1.2 转氨酶法合成 L-高苯丙氨酸的研究进展

利用转氨酶法催化 OPBA 合成 L-HPA,目前存在底物抑制、底物 OPBA 和氨供体价格高、转氨酶效率低、需要过量氨基酸作为氨供体等问题。

底物浓度过高会抑制酶的活性甚至导致酶失活,为了解决底物 OPBA 的抑制问题,

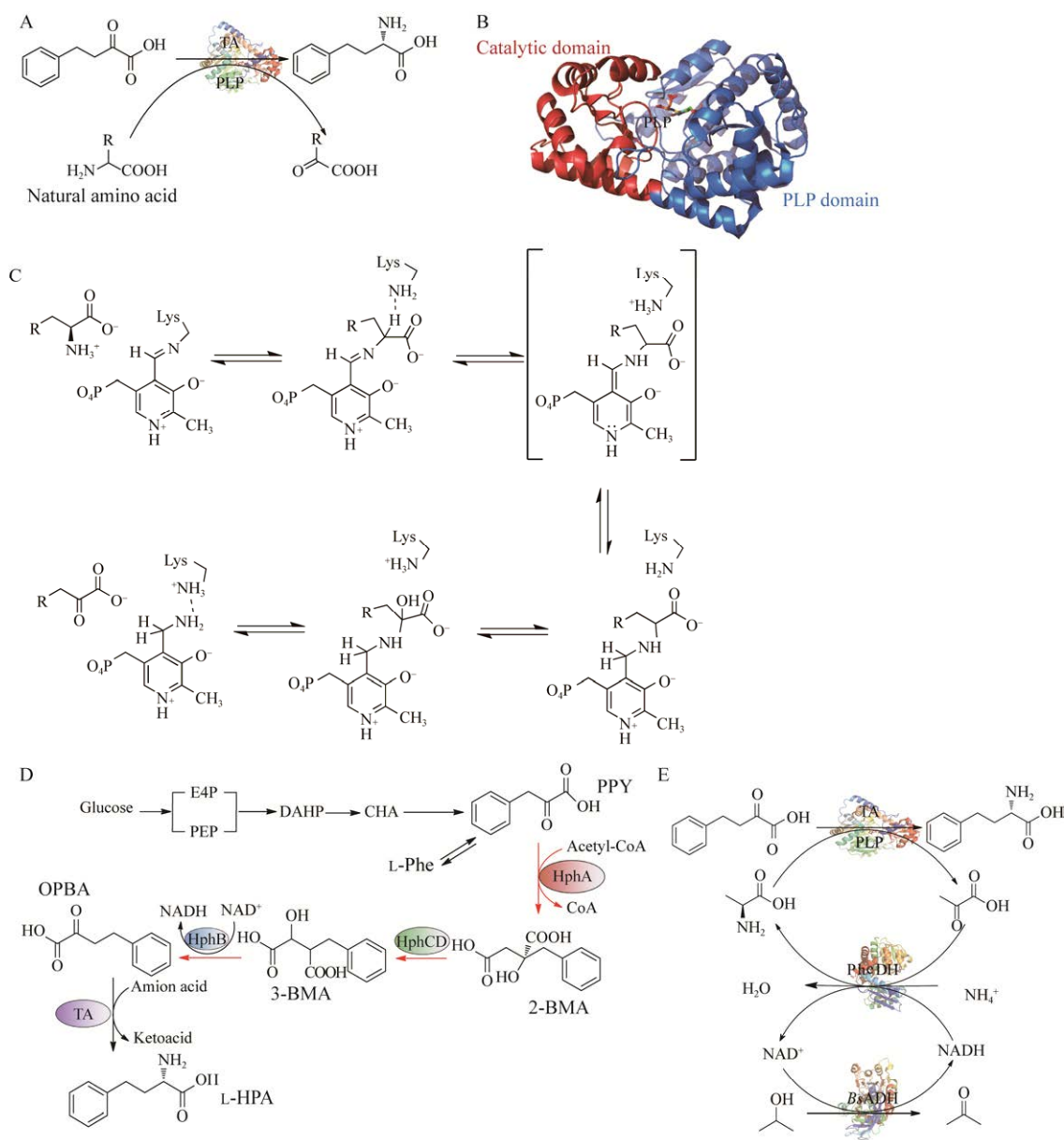


图 2 转氨酶结构、机制及转氨酶法合成 L-HPA 路线示意图 A: 转氨酶法合成 L-HPA. B: 天冬氨酸转氨酶晶体结构. C: 转氨酶催化机制^[13-14]. D: 发酵法合成 L-HPA^[15]. E: 三酶级联合成 L-HPA^[16]. TA: 转氨酶; PLP: 磷酸吡哆醛; E4P: 赤藓糖-4-磷酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; DAHP: 3-脱氧-阿拉伯-庚糖酸盐 7-磷酸; CHA: 分支酸; 4HPP: 4-羟基苯基丙酮酸; PPY: 苯基丙酮酸; L-Phe: L-苯丙氨酸; PheDH: 苯丙氨酸脱氢酶; BsADH: 醇脱氢酶

Figure 2 Structure and mechanism of transaminase and schematic diagram of L-HPA synthesis route by transaminase process. A: Synthesis of L-HPA by transaminase. B: Crystal structure of aspartate aminotransferase. C: Catalytic mechanism of transaminase^[13-14]. D: Synthesis of L-homophenylalanine by fermentation^[15]. E: Synthesis of L-HPA catalyzed by three enzyme cascades^[16]. TA: Transaminase; PLP: Pyridoxal phosphate; E4P: Erythrose 4-phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; DAHP: 3-deoxy-arabino-heptulonate 7-phosphate; CHA: Chorismic acid; 4HPP: 4-hydroxyphenylpyruvate; PPY: Phenylpyruvate; L-Phe: L-phenylalanine; PheDH: Phenylalanine dehydrogenase; BsADH: Alcohol dehydrogenase.

Cho 等^[19]筛选到来源于肠杆菌(*Enterobacter* sp.) BK2K-1 的芳香族氨基酸转氨酶, 以 L-天冬氨酸作为氨基供体, 催化 OPBA 合成 L-HPA。为了避免 OPBA 的抑制作用, 采用分批补料的方式, 以细胞破碎上清液为催化剂进行催化, 最终使 840 mmol/L 的 OPBA 转化为 L-HPA, 产量为 141.2 g/L, 转化率>94%, ee>99%。

底物的价格以及是否容易获得是评价能否工业化的一个重要条件, 为了解决底物价格昂贵的问题, 一方面采用更为廉价的氨基酸作为氨基供体, 如在利用天冬氨酸转氨酶合成 L-HPA 时, 可使用相对廉价的 L-赖氨酸作为氨基供体; 随后通过定点突变提高转氨酶对 L-赖氨酸的利用效率, 得到一个双突变体 R292E/L18H, 其对 L-赖氨酸的比酶活增加了 12.9 倍; 最终通过全细胞催化, 将 200 mmol/L OPBA 转化为 L-HPA, 产量为 34.7 g/L, 产率为 97%^[20]。另一方面是通过更为廉价的方式合成 2-氧代-4-苯基丁酸, 如南京工业大学黄和教授团队首先通过化学法将苯丙酸乙酯与草酸二乙酯通过缩合、水解反应获得 2-氧代-4-苯基丁酸; 随后, 利用天冬氨酸转氨酶将化学法得到的 2-氧代-4-苯基丁酸, 以 L-谷氨酸作为氨基供体合成 L-高苯丙氨酸; 在优化反应条件后, 将 20 g/L 的 2-氧代-4-苯基丁酸在 8 h 内转化为 L-HPA, 产量为 18.1 g/L, 生产强度为 2.26 g/(L·h), 转化率为 90%^[21]。

天津大学赵广荣教授团队以葡萄糖为底物通过发酵法获得了 OPBA。通过收集假定的 L-HPA 生物合成基因簇, 将系统发育分析与目标代谢物丰度映射相结合, 挖掘了生物合成基因簇的候选基因。然后采用迭代设计-构建-测试的方法, 评价不同物种的候选基因的组合对合成的影响, 最终在念珠藻(*Nostoc punctiforme*)

PCC73102.9 中发现了 L-HPA 的生物合成基因簇^[22-25], 4 种酶参与 L-HPA 的生物合成(图 2D): 苯丙酮酸合成酶催化苯丙酮酸与乙酰辅酶 A 缩合形成 2-苄基苹果酸(2-benzylmalic acid, 2-BMA); 苹果酸苄酯异构酶使 2-BMA 的一个羟基异构化, 形成 3-苄基苹果酸(3-benzylmalic acid, 3-BMA); 苹果酸苄酯脱氢酶参与 3-BMA 的氧化, 随后自发脱羧生成 OPBA, 然后由转氨酶生成 L-HPA。在增强代谢通量后, 工程菌株在摇瓶中能合成 1.41 g/L 的 L-HPA^[15]。

转氨酶法需要过量的天然氨基酸作为氨基供体推动反应向产品合成方向进行, 为了解决氨基供体过量的问题, 浙江大学杨立荣教授团队开发了三酶级联体系(图 2E): 将芳香氨基酸转氨酶、苯丙氨酸脱氢酶、醇脱氢酶进行级联, 以 L-丙氨酸作为氨基供体, 以异丙醇作为辅酶再生底物, 能在 2 h 内将 10 mmol/L 2-氧代-4-苯基丁酸转化为 1.79 g/L 的 L-HPA, 转化率接近 100%, 生产强度为 0.89 g/(L·h), ee>99%^[16]。

2 海因酶法合成 L-高苯丙氨酸

海因酶法近 30 年来在生产 β -内酰胺类抗生素侧链的氨基酸方面取得了巨大成功, 包括 L-蛋氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和左旋多巴(levodopa, L-DOPA)^[26-30]。基于相同的原理, 海因酶法也应用于合成 L-高苯丙氨酸, 通过将 L-海因酶(又称乙内酰脲酶, EC 3.5.2.2)与 L-氨甲酰水解酶(EC 3.5.1.87)进行级联, 以苯乙基海因为底物生成 L-HPA, 仅有 CO₂ 和 NH₃ 等副产物生成(图 3A)。底物苯乙基海因依赖于化学合成, 最通用的方法是 Bucherer-Bergs 法, 也可由氨基酸和氰酸钾在酸性条件下逆向合成。

2.1 酶元件的结构与机制

海因酶根据其作用的底物特异性或光学活

性不同,可分为L型、D型或无选择型海因酶,其功能是水解单取代海因生成N-氨甲酰-L-氨基酸。在海因酶法合成氨基酸过程中,L-氨甲酰水解酶是主要的限速酶,而已有研究尚不能揭示L-氨甲酰水解酶的催化机制,需待后续的研究,因此本文仅对其结构进行介绍。

氨甲酰水解酶分为D型和L型,L-氨甲酰水解酶能立体选择性地催化N-氨甲酰-L-氨基酸的氨甲酰基中的酰胺键断裂,生成相应构型的氨基酸、氨和CO₂。目前仅有来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)的L-氨甲酰水解酶的结构被解析(图3B)。为二聚体结构,单体结构是由4层 α/β 折叠片构成,每层 β 折叠片的两侧被2层 α 螺旋包裹着。L-氨甲酰水解酶分为“催化”和“二聚”结构域,催化结构域包括1-207和326-409残基,二聚结构域包含208-325残基^[31],其中Arg234已被证明对酶的二聚化至关重要,Arg234的突变会阻止酶二聚化并导致酶完全丧失活性。

2.2 海因酶法合成L-高苯丙氨酸的研究进展

海因酶法合成L-HPA主要存在酶活性较低、酶催化剂重复利用和副产物积累等问题。

高活性的酶元件是高产的前提条件,为了解决产量低的问题,Hsu等^[32]筛选到耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*) BCRC12827来源的海因酶,对苯乙基海因表现出高的外消旋活性,比酶活为1.31 U/mg。随后,将所获得的海因酶与来自卡氏芽孢杆菌(*Bacillus kaustophilus*) BCRC11223的L-氨甲酰化酶基因在大肠杆菌细胞中共表达。将重组细胞用0.5%甲苯在30℃下处理30 min,提升细胞渗透性,高渗透性的重组大肠杆菌细胞,可将150 mmol/L苯乙基海因转化为L-HPA,产率达到99%,产量为26.8 g/L,生产强度为1.34 g/(L·h)。

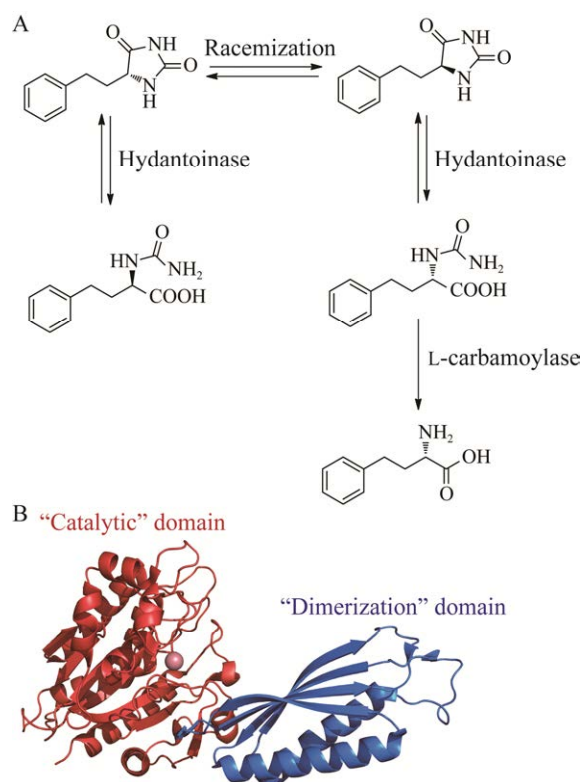


图3 海因酶法合成L-HPA路线图及L-氨甲酰水解酶结构 A: 海因酶法合成L-HPA. B: L-氨甲酰水解酶晶体结构(PDB ID: 3N5F)

Figure 3 Schematic diagram of L-HPA synthesis route by hydantoinase process and structure of L-carbamoylase. A: Synthesis of L-HPA by hydantoinase process. B: Crystal structure of L-carbamoylase.

为了重复利用酶催化剂,以降低生产成本。将L-海因酶和L-氨甲酰化酶共价固定在Eupergit C上,利用苯乙基海因合成L-高苯丙氨酸。固定化的酶pH和温度适用范围更广,弥补了2种游离酶最佳反应pH之间的差距,从而使2种酶在单个反应器中的利用成为可能。在最佳条件下,固定化的L-海因酶和L-N-氨甲酰化酶表现出良好的稳定性,其比活性分别为0.79 U/mg和2.91 U/mg。固定化的L-海因酶在反复循环使用40次后活性保持不变,L-N-氨甲酰化酶在14个循环后活性仅下降了40%^[33]。

由于 L-海因酶的选择性较差,会导致 N-氨基甲酰基-D-氨基酸副产物的积累。为此, Rodríguez-Alonso 等设计了一种四酶级联体系称作双外消旋酶-海因酶法:来源于根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) BQL9 的 D-海因酶、来源于根癌农杆菌 C58 的海因外消旋酶、来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌 CECT43 的 L-N-氨甲酰化酶以及来自嗜热卡氏芽孢杆菌 (*Geobacillus kaustophilus*) 的 N-琥珀酰氨基酸外消旋酶。这种海因酶法的基础上加入 N-琥珀酰氨基酸外消旋酶的方式,避免了 N-氨基甲酰基-D-氨基酸在反应中的积累,在最佳反应条件下,可使 100 mmol/L 的苯乙基海因完全转化为 17.9 g/L 的 L-HPA, ee>99%^[29]。

3 脱羧酶法合成 L-高苯丙氨酸

脱羧酶法是利用 L-天冬氨酸 β-脱羧酶 (L-aspartate β-decarboxylase, AspBDC, EC 4.1.1.12), 以 3(R)-3-苄基-L-天冬氨酸为底物发生 β-脱羧生成 L-HPA (图 4A)。

3.1 酶元件 L-天冬氨酸 β-脱羧酶的结构与机制

目前 L-天冬氨酸脱羧酶可分为 L-天冬氨酸 α-脱羧酶和 L-天冬氨酸 β-脱羧酶。L-天冬氨酸 β-脱羧酶是目前唯一的 β-型氨基酸脱羧酶,其天然底物为 L-天冬氨酸,催化脱羧生成 L-丙氨酸。来源于假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) ATCC 19121 的 L-天冬氨酸 β-脱羧酶晶体结构(图 4B)^[34], 是 6 个同型二聚体组合而成的十二聚体,碱性环境会使酶逐渐解聚为二聚体,酶活性降低。但已有晶体结构信息尚不足以揭示其催化机理,需待后续的研究。

3.2 脱羧酶法合成 L-高苯丙氨酸的研究进展

目前脱羧酶法生产 L-HPA 主要问题是 L-天冬氨酸 β-脱羧酶对 3(R)-3-苄基-L-天冬氨酸的催

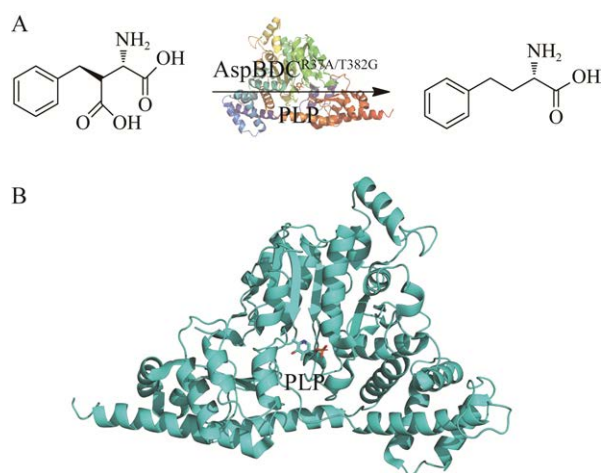


图 4 脱羧酶法合成 L-HPA 示意图及脱羧酶结构 A: 脱羧酶法合成 L-高苯丙氨酸. B: L-天冬氨酸 β-脱羧酶晶体结构(PDB ID: 2ZY2)

Figure 4 Schematic diagram of L-HPA synthesis by decarboxylase process and structure of decarboxylase. A: Synthesis of L-homophenylalanine by decarboxylase. B: Crystal structure of L-aspartate β-decarboxylase.

化效率低。华东理工大学许建和教授团队首先将 L-天冬氨酸通过化学法转成 3(R,S)-3-苄基-L-天冬氨酸,随后拆分得到 3(R)-3-苄基-L-天冬氨酸。来源于德阿昆哈假单胞菌 (*Pseudomonas dacunhae*) 的 L-天冬氨酸 β-脱羧酶对 3(R)-3-苄基-L-天冬氨酸具有较微弱的活性。随后,通过半理性设计方法对该酶进行蛋白质工程改造,突变体 T382G/R37A 的比活力是野生型的 15 400 倍,利用上述突变体催化 10 mmol/L 3(R)-3-苄基-L-天冬氨酸生产 1.3 g/L 的 L-HPA,生产强度为 0.26 g/(L·h),产率为 73%, ee>99%^[35]。

4 脱氢酶法合成 L-高苯丙氨酸

脱氢酶法合成 L-高苯丙氨酸是利用氨基酸脱氢酶如苯丙氨酸脱氢酶(EC 1.4.1.20)、谷氨酸脱氢酶(EC 1.4.1.2)等将 OPBA 通过还原氨化反应并利用游离的氨作为氨供体合成 L-高苯丙

氨酸。反应过程需要辅酶 NADH，但因 NADH 价格昂贵，研究过程中需要引入甲酸脱氢酶辅酶再生系统或者葡萄糖脱氢酶辅酶再生系统，生成大量 NADH，以节约生产成本(图 5A)。

4.1 酶元件氨基酸脱氢酶的结构和机制

苯丙氨酸脱氢酶的天然底物为苯丙酮酸，而 OPBA 结构与苯丙酮酸相似，因此生产 L-HPA 的氨基酸脱氢酶主要是苯丙氨酸脱氢酶。主要来源于中温放线菌(*Thermoactinomyces intermedius*)^[36]、栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius*)^[37]、红球菌属(*Rhodococcus* sp.) M4^[38]、嗜热卡氏芽孢杆菌(*Geobacillus kaustophilus*)^[37]、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)^[39]。目前仅有红球菌属(*Rhodococcus* sp.) M4 来源的苯丙氨酸脱氢酶晶体结构被解析^[40]，为同源二聚体结构，包含催化结构域和 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β -Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)结构域，与亮氨酸脱氢酶的结构相近(图 5B)。

谷氨酸脱氢酶催化的天然反应是催化谷氨

酸氧化脱氨生成 α -酮戊二酸。谷氨酸脱氢酶主要来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[41]、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)^[42]和大肠杆菌(*E. coli*)^[43]等。谷氨酸脱氢酶主要为六聚体，由 2 个三聚体相互叠加在一起而形成^[44,45]。这 2 个三聚体由一条裂隙分开，分别为谷氨酸脱氢酶的催化域及底物结合域。在底物结合口袋与谷氨酸结合后，酶通过弯曲 2 个区域间的裂隙来形成不同的构象。当不结合底物时，谷氨酸脱氢酶呈现打开状态；而一旦与底物或者辅酶结合后，会转变为闭合状态。在闭合状态，酶的关键催化残基距离底物更近，从而使酶反应更容易发生^[41,44,46]。

以 *Rhodococcus* sp. M4 来源的苯丙氨酸脱氢酶为例介绍酶催化机理。首先底物 L-苯丙氨酸、NAD⁺进入活性中心，以两性离子状态与酶结合并处于活化状态。Lys78 通过水分子催化 α -氨基基团去质子化，然后质子氢转移到 NAD⁺分子上，形成亚胺离子，底物的 R-羧酸与 Lys66 以静

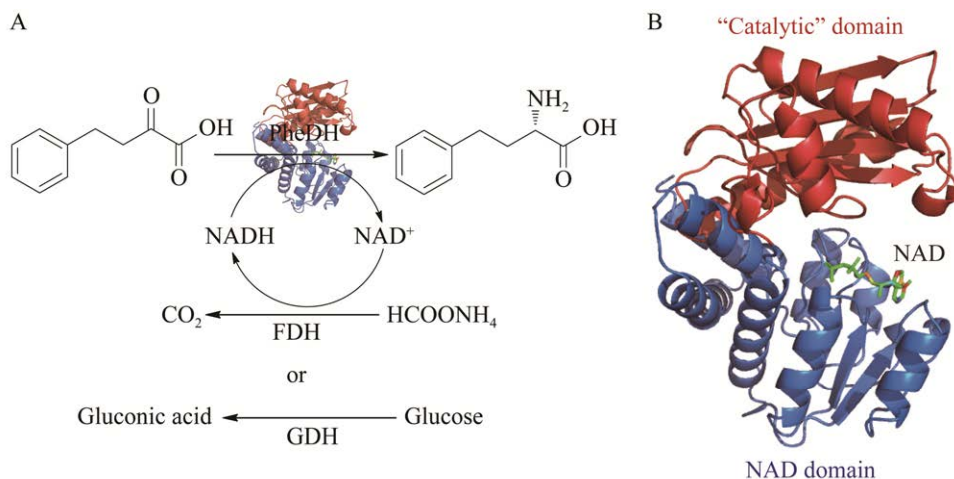


图 5 脱氢酶法合成 L-HPA 示意图及脱氢酶结构 A: 脱氢酶法合成 L-高苯丙氨酸. PheDH: 苯丙氨酸脱氢酶; FDH: 甲酸脱氢酶; GDH: 葡萄糖脱氢酶. B: 苯丙氨酸脱氢酶晶体结构

Figure 5 Schematic diagram of L-HPA synthesis by dehydrogenase process and structure of dehydrogenase. A: Synthesis of L-homophenylalanine by dehydrogenase. PheDH: Phenylalanine dehydrogenase; FDH: Formate dehydrogenase; GDH: Glucose dehydrogenase. B: Crystal structure of phenylalanine dehydrogenase.

电相互作用, 并与 Asn262 和 Lys78 形成氢键。Lys78 催化活化水分子, 通过亲电子碳攻击亚胺离子, 形成甲醇胺中间体。以 Lys78 作为碱, 对甲醇胺进行去质子化, 而 Asp118 则给离去的氨基基团加氢, 生成的苯丙酮酸和氨离开活性中心^[40]。

4.2 脱氢酶法合成 L-HPA 的研究进展

脱氢酶法合成 L-HPA 遇到的问题有: (1) 辅酶再生体系; (2) 底物抑制; (3) 酶重复利用; (4) 酶催化效率低; (5) 底物价格昂贵。

高效辅酶再生体系可以减少辅酶用量并同时提高产量。Bradshaw 等^[47]将来自 *Rhodococcus* sp. M4 的苯丙氨酸脱氢酶与甲酸脱氢酶进行级联合成 L-HPA, 产率达到 63%。在进一步比较甲酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶再生体系的稳定性时发现, 葡萄糖脱氢酶比甲酸脱氢酶更加稳定。且 NaCl 不抑制酶活性时, 葡萄糖脱氢酶体系优于甲酸脱氢酶辅酶再生系统。

为了解决底物抑制, 中国药科大学陈依军教授^[36]团队将苯丙氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶进行级联生产 L-HPA, 通过分批补加底物策略, 解决了底物抑制。最终将 510 mmol/L 的底物转化为 L-HPA, 产量为 84.4 g/L, 转化率为 92.5%, 生产强度为 3.5 g/(L·h)。尽管分批补料可解决底物抑制问题, 但这种方式比较繁琐, 增加了生产成本。随后, 该团队通过基于微粒 Eudragit RS100 的底物释放控制策略, 将全部酮酸底物封控在微粒中并控制底物释放速度, 在反应 33 h 后, 产量达到 71.6 g/L, 转化率为 80%, 生产强度为 2.15 g/(L·h)。这种方式解决了底物抑制的同时又避免了繁琐的补料分批工艺^[48]。

为了促使酶重复利用, Ahmad 等^[49]通过膜生物反应器, 将苯丙氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶截留在膜内, 实现了酶的多次重复利用, 在最优反应 pH 为 8.5 条件下, 其产率大于 80%, ee>99%。另一个典型例子是通过酶固定化技术

将苯丙氨酸脱氢酶共价固定在酶载体 Eupergit CM 上, 固定化的苯丙氨酸脱氢酶的 pH 范围和温度范围略有扩大。最终固定化的苯丙氨酸脱氢酶可重复利用 9 次, 每次可将 10 mmol/L 的 OPBA 转化为 L-HPA, 产量为 1.4 g/L, 产率超过 80%^[38]。

为了进一步提高苯丙氨酸脱氢酶的催化效率, 江南大学聂尧教授团队通过改造来源于巴迪斯芽孢杆菌(*Bacillus badius*)的苯丙氨酸脱氢酶, 获得了一个最佳三突变体 V309G/L306V/V144G, 其催化效率比野生型高 12.9 倍。与葡萄糖脱氢酶辅酶再生体系连用, 通过分批补料策略在 210 min 内将 1.08 mol/L 的 OPBA 转化为 L-HPA, 产量为 174 g/L, 转化率为 90.2%, 生产强度为 49.7 g/(L·h)^[37]。

为了进一步降低原料成本, 本文通信作者刘立明教授团队对 L-HPA 进行生物逆合成分析^[50-52], 如图 6A 所示, 采用有机合成切断法对 C-C 键进行异裂或均裂和官能团互变(functional group interconversions, FGIs)方法, 将 L-HPA 拆分为 C8+C2、C7+C3、C6+C4 砌块分子库。首先探索了 C8+C2 模块(苯乙醛和甘氨酸)作为起始原料, 通过手性重置的四酶级联方案合成 L-HPA (图 6B), 其路线为: (1) 苯乙醛 **1** 和甘氨酸 **2** 在苏氨酸醛缩酶的催化下生成 **3**; (2) **3** 在苏氨酸脱氢酶催化下生成 **4**; (3) **4** 在苯丙氨酸脱氢酶催化下形成 L-高苯丙氨酸 **5**; (4) 甲酸脱氢酶用于 NADH 的再生^[53]。对全细胞转化体系进行优化, 使 L-HPA 产量进一步提高至 1.23 g/L, 转化率为 34.2%^[54]。然而, 由于苯乙醛易导致路径酶失活, 导致产量较低。随后, 该团队又设计了 C7+C3 模块(苯甲醛和丙酮酸)作为起始原料, 通过一个 3 步生物级联途径来合成 L-HPA (图 6C), 其路线为: 苯甲醛 **6** 和丙酮酸 **7** 通过醛缩酶转化为 **8**; **8** 自发脱水形成 **9**;

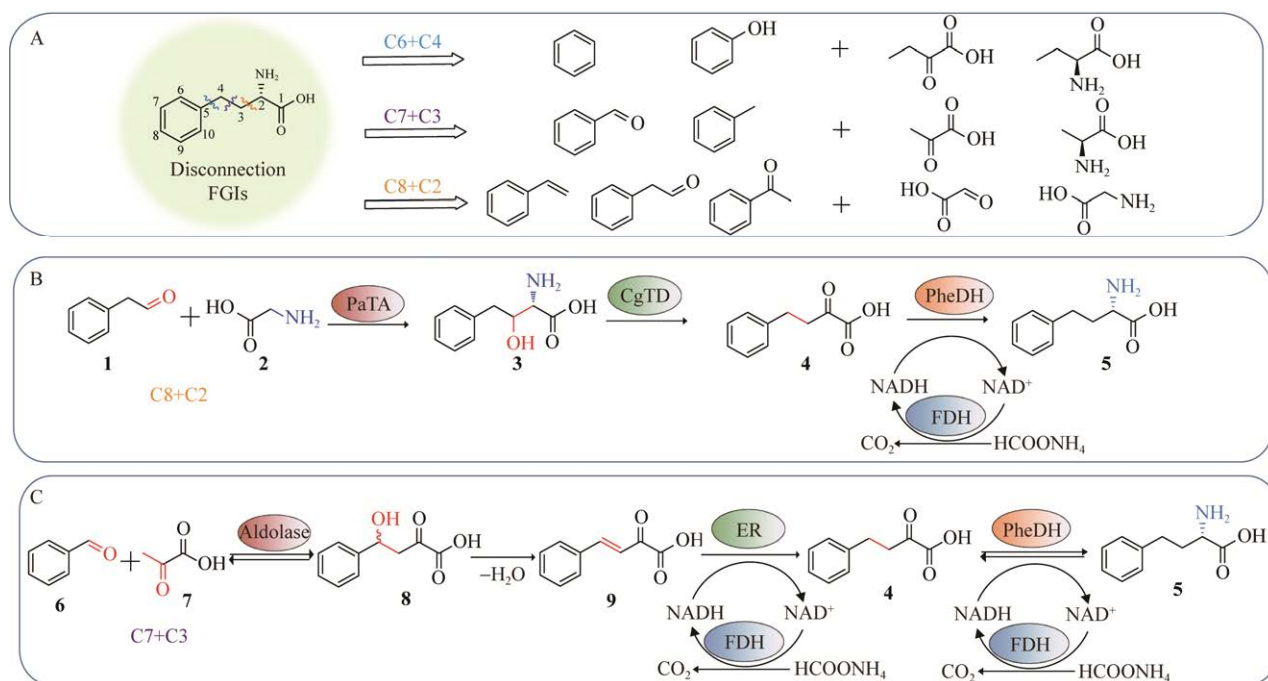


图 6 生物逆合成分析法合成 L-HPA^[53-55] A: 通过有机合成切断法和官能团的相互转化将 L-HPA 拆分为廉价的合成砌块. B: 以苯乙醛和甘氨酸为起始原料的 L-HPA 生物合成路线. C: 以苯甲醛和丙酮酸为起始原料的 L-HPA 生物合成路线. *PaTA*: 苏氨酸醛缩酶; *CgTD*: 苏氨酸脱氨酶; *ER*: 烯还原酶
 Figure 6 Synthesis of L-HPA by biological reverse synthesis analysis^[53-55]. A: L-HPA was separated into cheap synthetic blocks by disconnection approach and functional group interconversions. B: Biosynthesis route of L-HPA with phenylacetaldehyde and glycine as starting materials. C: Biosynthesis route of L-HPA with benzaldehyde and pyruvate as starting materials. *PaTA*: Threonine aldolase; *CgTD*: Threonine deaminase; *ER*: Ene reductase.

9 通过烯还原酶转化为 4; 4 通过苯丙氨酸脱氢酶转化为 L-HPA。甲酸脱氢酶用于 NADH 辅酶再生^[55]。随后, 通过对路径酶进行深入的筛选、表达优化、蛋白质工程和反应条件优化等工作, 在 5 L 反应器中获得了 100.9 g/L 的 L-HPA, 转化率为 94%, 生产强度为 5.61 g/(L·h)。

5 酶法合成 L-高苯丙氨酸方法的比较

对不同酶法合成工艺在起始底物成本、产量、转化率等方面进行比较, 为 L-HPA 工业化进程奠定基础, 如表 1 所示。转氨酶法的最高产量已达到 141.20 g/L, 转化率为 94%^[19]。但

转氨酶法需要过量的天然氨基酸作为氨基供体, 不利于工业化生产。为此, 研究人员通过设计新型三酶级联体系, 循环使用氨基供体, 但产量仅有 1.80 g/L^[16]。限制转氨酶法工业化应用的另一问题是底物 OPBA 价格昂贵, 虽然可以葡萄糖为底物, 通过代谢工程合成了 OPBA, 但 L-HPA 产量仅有 1.41 g/L^[15]。

海因酶法最高产量可以达到 17.90 g/L, 具有完全转化且没有底物抑制等优点, 但目前海因酶法的底物苯乙基海因需要化学合成, 合成方式繁琐, 需要有毒试剂, 同时产量较低。

脱羧酶法最高产量为 1.31 g/L, 转化率为 73%^[35]。产量和转化率较低, 但不需要辅因子。

表 1 酶法合成 L-高苯丙氨酸生产工艺的比较

Table 1 Comparison of enzymatic production of L-homophenylalanine

Enzymatic process	Entry	Substrate	Yield (g/L)	ee (%)	Conversion (%)	Advantages	Disadvantages	References
Transaminase process	1	OPBA, L-aspartic acid	141.20	99	94.0	1 High catalytic efficiency 2 High yield 3 No cofactor required	1 High price of OPBA 2 Reversible reaction 3 Excessive ammonia donor required	[19]
	2	OPBA, L-alanine, Isopropanol	1.80	99	100.0	1 Low price of ammonia donor and no need for excess	1 High price of OPBA 2 Low yield	[16]
	3	Glucose	1.41	99	—	1 Low price of glucose	1 Low yield 2 Long fermentation cycle and high fermentation cost	[15]
Hydantoinase process	4	Phenylethyl hydantoin	17.90	99	100.0	1 No substrate inhibition 2 No cofactor required	1 Substrate dependent on chemical synthesis 2 Low yield	[29]
Decarboxylase process	5	3(R)-benzyl-L-aspartate	1.31	99	73.0	1 Low substrate price	1 Substrate dependent on chemical synthesis 2 Low yield	[35]
Dehydrogenase process	6	OPBA	174.00	99	90.2	1 High catalytic efficiency 2 High yield 3 No reversible reaction	1 High price of OPBA 2 NAD ⁺ cofactor required 3 Substrate inhibition	[37]
	7	Benzaldehyde, pyruvate	100.90	99	94.0	1 Low substrate price 2 High yield	1 NAD ⁺ cofactor required	[55]

其采用的底物是依赖 L-天冬氨酸作为底物，通过化学工艺合成，但化学工艺繁琐，需要经拆分获得，不利于工业化生产。

脱氢酶法最高产量为 174.00 g/L，转化率为 90.2%^[37]，但脱氢酶法同样面临底物 OPBA 价格高昂的问题。为此，笔者课题组通过逆合成分析得到级联路线，以廉价的苯甲醛和丙酮酸为原料合成 OPBA，与利用 OPBA 为原料的生产工艺相比，原料成本降低了 17.4 倍，L-HPA 产量达到 100.9 g/L，转化率为 94%，在保持较高产量的同时解决了底物昂贵的问题^[55]。

6 结论与展望

L-高苯丙氨酸在手性药物生产中具有十分重要的应用价值，目前酶法合成 L-高苯丙氨酸

的研究仍在继续，主要包括：一方面是对现有生产工艺的优化，如通过酶固定化技术增加脱氢酶的稳定性、利用膜生物反应器将酶封装在膜内，增加酶重复利用次数、蛋白质工程改造提高催化效率和稳定性。另一方面是开发能利用廉价原料的新型级联路径，如构建能利用葡萄糖的基因工程菌或通过生物逆合成分析开发的级联路径等。然而，目前生产工艺在底物和产量上难以同时兼顾，部分工艺保证了底物廉价但产量较低、部分工艺产量较高但所用原料价格高昂。

为了降低底物价格的同时提高 L-高苯丙氨酸的产量，今后研究需要在以下几个方面进行深入研究：(1) 开发利用廉价原料的新路线；(2) 通过酶工程提高酶的性能，获得高效的生

物催化剂；(3) 提高酶催化剂的重复利用率，降低生产成本。

REFERENCES

- [1] AHMAD AL, OH PC, ABD SHUKOR SR. Sustainable biocatalytic synthesis of L-homophenylalanine as pharmaceutical drug precursor[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(3): 286-296.
- [2] 王增武. 中国高血压流行和防治现状[J]. *中国心血管病研究*, 2022, 20(8): 673-678.
WANG ZW. Epidemiology and management status of hypertension in China[J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Research*, 2022, 20(8): 673-678 (in Chinese).
- [3] WANG L, MURAI Y, YOSHIDA T, OKAMOTO M, TACHRIM Z, HASHIDOKO Y, HASHIMOTO M. Utilization of acidic α -amino acids as acyl donors: an effective stereo-controllable synthesis of aryl-keto α -amino acids and their derivatives[J]. *Molecules*, 2014, 19(5): 6349-6367.
- [4] BALDWIN JE, MOLONEY MG, NORTH M. Non-proteinogenic amino acid synthesis. The β -anion derived from aspartic acid, and its application to α -amino acid synthesis[J]. *Tetrahedron*, 1989, 45(19): 6309-6318.
- [5] OLDFIELD MF, BOTTING NP. Synthesis of [1- 13 C] and [1- 15 N] labelled DL-homophenylalanine via a key Neber rearrangement[J]. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1998, 41(1): 29-36.
- [6] 张婷, 徐时良, 李景华. 高苯丙氨酸的合成新工艺研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2011, 39(3): 264-267.
ZHANG T, XU SL, LI JH. Study on a new process for the synthesis of homophenylalanine[J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2011, 39(3): 264-267 (in Chinese).
- [7] BELL EL, FINNIGAN W, FRANCE SP, GREEN AP, HAYES MA, HEPWORTH LJ, LOVELOCK SL, NIIKURA H, OSUNA S, ROMERO E, RYAN KS, TURNER NJ, FLITSCH SL. Biocatalysis[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1: 46.
- [8] WU SK, SNAJDROVA R, MOORE JC, BALDENIUS K, BORNSCHEUER UT. Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(1): 88-119.
- [9] HANEFELD U, HOLLMANN F, PAUL CE. Biocatalysis making waves in organic chemistry[J]. *Chemical Society Reviews*, 2022, 51(2): 594-627.
- [10] DEVINE PN, HOWARD RM, KUMAR R, THOMPSON MP, TRUPPO MD, TURNER NJ. Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2018, 2(12): 409-421.
- [11] KELLY SA, MIX S, MOODY TS, GILMORE BF. Transaminases for industrial biocatalysis: novel enzyme discovery[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4781-4794.
- [12] GUO F, BERGLUND P. Transaminase biocatalysis: optimization and application[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(2): 333-360.
- [13] SLABU I, GALMAN JL, LLOYD RC, TURNER NJ. Discovery, engineering, and synthetic application of transaminase biocatalysts[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(12): 8263-8284.
- [14] MUESER TC, DRAGO V, KOVALEVSKY A, DAJNOWICZ S. Pyridoxal 5'-phosphate dependent reactions: analyzing the mechanism of aspartate aminotransferase[M]//*Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 333-359.
- [15] LIU ZN, LEI DW, QIAO B, LI SL, QIAO JJ, ZHAO GR. Integrative biosynthetic gene cluster mining to optimize a metabolic pathway to efficiently produce L-homophenylalanine in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(11): 2943-2954.
- [16] ZHOU HS, MENG LJ, YIN XJ, LIU YY, XU G, WU JP, WU MB, YANG LR. Artificial biocatalytic cascade with three enzymes in one pot for asymmetric synthesis of chiral unnatural amino acids[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2019, 2019(38): 6470-6477.
- [17] GRISWOLD WR, FISHER AJ, TONEY MD. Crystal structures of aspartate aminotransferase reconstituted with 1-deazapyridoxal 5'-phosphate: internal aldimine and stable L-aspartate external aldimine[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(26): 5918-5924.
- [18] JEONG SY, JIN H, CHANG JH. Crystal structure of L-aspartate aminotransferase from *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0221975.
- [19] CHO BK, SEO JH, KANG TW, KIM BG. Asymmetric synthesis of L-homophenylalanine by equilibrium-shift using recombinant aromatic L-amino acid transaminase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(2): 226-234.
- [20] LO HH, HSU SK, LIN WD, CHAN NL, HSU WH. Asymmetrical synthesis of L-homophenylalanine using engineered *Escherichia coli* aspartate aminotransferase[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 21(2): 411-415.

- [21] 贾红华, 陈永生, 陈美娟, 韦萍, 黄和. 化学-酶法制备 L-高苯丙氨酸[J]. 生物加工过程, 2008, 6(6): 30-34. JIA HH, CHEN YS, CHEN MJ, WEI P, HUANG H. Process for producing of L-homeoophenylalanine by chemo-enzymatic method[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2008, 6(6): 30-34 (in Chinese).
- [22] ENTFELLNER E, FREI M, CHRISTIANSEN G, DENG L, BLOM J, KURMAYER R. Evolution of anabaenopeptin peptide structural variability in the *Cyanobacterium planktothrix*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 219.
- [23] LIMA ST, ALVARENGA DO, ETCHEGARAY A, FEWER DP, JOKELA J, VARANI AM, SANZ M, DÖRR FA, PINTO E, SIVONEN K, FIORE MF. Genetic organization of anabaenopeptin and spumigin biosynthetic gene clusters in the *Cyanobacterium Sphaerospermopsis torques-reginae* ITP-024[J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(3): 769-778.
- [24] SHISHIDO TK, JOKELA J, FEWER DP, WAHLSTEN M, FIORE MF, SIVONEN K. Simultaneous production of anabaenopeptins and namalides by the *Cyanobacterium Nostoc* sp. CENA543[J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(11): 2746-2755.
- [25] KOKETSU K, MITSUHASHI S, TABATA K. Identification of homophenylalanine biosynthetic genes from the *Cyanobacterium nostoc punctiforme* PCC73102 and application to its microbial production by *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2201-2208.
- [26] PALOYAN AM, MELKONYAN LH, AVETISOVA GY. Microbial approaches for amino acids production[M]// Microbial Syntrophy-Mediated Eco-enterprising. Amsterdam: Elsevier, 2022: 177-208.
- [27] LAS HERAS-VÁZQUEZ FJ, RODRÍGUEZ-VICO F, MOYEJA LMC, CLEMENTE-JIMÉNEZ JM. Immobilized double-racemase hydantoinase process for L-amino acid production[M]//Current Perspectives on Chemical Sciences Vol. 10. Almeria: Book Publisher International (a part of SCIENCEDOMAIN International), 2021: 119-131.
- [28] ENGINEER AS, YADAV KK, KSHIRSAGAR PR, DHAKEPHALKAR PK. A novel, enantioselective, thermostable recombinant hydantoinase to aid the synthesis of industrially valuable non-proteinogenic amino acids[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109554.
- [29] RODRÍGUEZ-ALONSO MJ, CLEMENTE-JIMÉNEZ JM, RODRÍGUEZ-VICO F, LAS HERAS-VÁZQUEZ FJ. Rational re-design of the “double-racemase hydantoinase process” for optically pure production of natural and non-natural L-amino acids[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 101: 68-76.
- [30] HERAS-VAZQUEZ F, CLEMENTE-JIMENEZ J, MARTINEZ-RODRIGUEZ S, RODRIGUEZ-VICO F. Optically pure α -amino acids production by the “hydantoinase process”[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2008, 2(1): 35-46.
- [31] MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ S, GARCÍA-PINO A, LAS HERAS-VÁZQUEZ FJ, CLEMENTE-JIMÉNEZ JM, RODRÍGUEZ-VICO F, GARCÍA-RUIZ JM, LORIS R, GAVIRA JA. Mutational and structural analysis of L-N-carbamoylase reveals new insights into a peptidase M20/M25/M40 family member[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(21): 5759-5768.
- [32] HSU SK, LO HH, LIN WD, CHEN IC, KAO CH, HSU WH. Stereoselective synthesis of L-homophenylalanine using the carbamoylase method with *in situ* racemization *via* N-acylamino acid racemase[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 856-862.
- [33] YEN MC, HSU WH, LIN SC. Synthesis of L-homophenylalanine with immobilized enzymes[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(5): 667-674.
- [34] CHEN HJ, KO TP, LEE CY, WANG NC, WANG AHJ. Structure, assembly, and mechanism of a PLP-dependent dodecameric L-aspartate β -decarboxylase[J]. Structure, 2009, 17(4): 517-529.
- [35] ZHANG M, HU PF, ZHENG YC, ZENG BB, CHEN Q, ZHANG ZJ, XU JH. Structure-guided engineering of *Pseudomonas dacunhae* L-aspartate β -decarboxylase for L-homophenylalanine synthesis[J]. Chemical Communications, 2020, 56(89): 13876-13879.
- [36] ZHANG JL, ZHU TY, WU XR, CHEN YJ. Enhancement of biocatalytic efficiency by increasing substrate loading: enzymatic preparation of L-homophenylalanine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19): 8487-8494.
- [37] WU T, MU XQ, XUE YY, XU Y, NIE Y. Structure-guided steric hindrance engineering of *Bacillus badius* phenylalanine dehydrogenase for efficient L-homophenylalanine synthesis[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 1-13.
- [38] AHMAD AL, LOW EM, Shukor SRA. Immobilization of phenylalanine dehydrogenase onto Eupergit CM for the synthesis of (S)-2-amino-4-phenylbutyric acid[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 88: 26-31.

- [39] ASANO Y, YAMADA A, KATO Y, YAMAGUCHI K, HIBINO Y, HIRAI K, KONDO K. Enantioselective synthesis of (*S*)-amino acids by phenylalanine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*: use of natural and recombinant enzymes[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1990, 55(21): 5567-5571.
- [40] BRUNHUBER NMW, THODEN JB, BLANCHARD JS, VANHOOKE JL. *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase: kinetics, mechanism, and structural basis for catalytic specificity[J]. Biochemistry, 2000, 39(31): 9174-9187.
- [41] YIN XJ, LIU YY, MENG LJ, ZHOU HS, WU JP, YANG LR. Semi-rational hinge engineering: modulating the conformational transformation of glutamate dehydrogenase for enhanced reductive amination activity towards non-natural substrates[J]. Catalysis Science & Technology, 2020, 10(10): 3376-3386.
- [42] WANG ZY, ZHOU HS, YU HR, PU ZJ, XU JL, ZHANG HY, WU JP, YANG LR. Computational redesign of the substrate binding pocket of glutamate dehydrogenase for efficient synthesis of noncanonical L-amino acids[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(21): 13619-13629.
- [43] LI H, LIAO JC. Development of an NADPH-dependent homophenylalanine dehydrogenase by protein engineering[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(1): 13-20.
- [44] PRAKASH P, PUNEKAR NS, BHAUMIK P. Structural basis for the catalytic mechanism and α -ketoglutarate cooperativity of glutamate dehydrogenase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(17): 6241-6258.
- [45] SANTERO E, ANA B, CANOSA I, GOVANTES F. Glutamate dehydrogenases: enzymology, physiological role and biotechnological relevance[M]// Dehydrogenases. Croatia: InTech, 2012: 289-318.
- [46] OIDE M, KATO T, OROGUCHI T, NAKASAKO M. Energy landscape of domain motion in glutamate dehydrogenase deduced from cryo-electron microscopy[J]. The FEBS Journal, 2020, 287(16): 3472-3493.
- [47] BRADSHAW CW, WONG CH, HUMMEL W, KULA MR. Enzyme-catalyzed asymmetric synthesis of (*S*)-2-amino-4-phenylbutanoic acid and (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid[J]. Bioorganic Chemistry, 1991, 19(1): 29-39.
- [48] ZHANG JL, TAO SS, ZHANG BJ, WU XR, CHEN YJ. Microparticle-based strategy for controlled release of substrate for the biocatalytic preparation of L-homophenylalanine[J]. ACS Catalysis, 2014, 4(5): 1584-1587.
- [49] AHMAD AL, OH PC, SHUKOR SRA. Synthesis of L-homophenylalanine via integrated membrane bioreactor: influence of pH on yield[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 52(2/3): 296-300.
- [50] FINNIGAN W, HEPWORTH LJ, FLITSCH SL, TURNER NJ. RetroBioCat as a computer-aided synthesis planning tool for biocatalytic reactions and cascades[J]. Nature Catalysis, 2021, 4(2): 98-104.
- [51] McINTOSH JA, BENKOVICS T, SILVERMAN SM, HUFFMAN MA, KONG J, MALIGRES PE, ITOH T, YANG H, VERMA D, PAN WL, HO HI, VROOM J, KNIGHT AM, HURTAK JA, KLAPARS A, FRYSZKOWSKA A, MORRIS WJ, STROTMAN NA, MURPHY GS, MALONEY KM, et al. Engineered ribosyl-1-kinase enables concise synthesis of molnupiravir, an antiviral for COVID-19[J]. ACS Central Science, 2021, 7(12): 1980-1985.
- [52] MCINTOSH JA, LIU ZJ, ANDRESEN BM, MARZIJARANI NS, MOORE JC, MARSHALL NM, BORRA-GARSKE M, OBLIGACION JV, FIER PS, PENG F, FORSTATER JH, WINSTON MS, AN CH, CHANG W, LIM J, HUFFMAN MA, MILLER SP, TSAY FR, ALTMAN MD, LESBURG CA, et al. A kinase-cGAS cascade to synthesize a therapeutic STING activator[J]. Nature, 2022, 603(7901): 439-444.
- [53] SONG W, WANG JH, WU J, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Asymmetric assembly of high-value α -functionalized organic acids using a biocatalytic chiral-group-resetting process[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1-9.
- [54] 刘佳, 宋伟, 郭亮, 陈修来, 高聪, 刘立明. 多酶组合催化制备 L-高苯丙氨酸[J]. 微生物学报, 2021, 61(9): 2829-2842.
LIU J, SONG W, GUO L, CHEN XL, GAO C, LIU LM. A multi-enzyme cascade reaction for the production of L-homophenylalanine[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(9): 2829-2842 (in Chinese).
- [55] GAO DK, SONG W, WU J, GUO L, GAO C, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Efficient production of L-homophenylalanine by enzymatic-chemical cascade catalysis[J]. Angewandte Chemie, 2022, 134(36): e202207077.

(本文责编 郝丽芳)