羰基还原酶及其催化不对称合成大基团手性羟基类化合物的研究进展

聂尧*, 徐岩

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

* 联系人, E-mail: ynie@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-11-03; 接受日期: 2019-01-29; 网络版发表日期: 2019-05-14

国家自然科学基金(批准号: 21336009, 21676120)和江苏省自然科学基金(批准号: BK20151124)资助

摘要 手性羟基化合物以其独特的光、热和化学性质广泛应用于医药、农药、精细化工、功能材料等行业。立体专一性羰基还原酶能够直接针对关键手性位点催化不对称还原潜手性底物获得目的手性产物。基于羰基还原酶的底物多样性, 具有不同化学结构和功能的醇类、酯类、氨基酸、环氧化合物等重要手性中间体能够通过不对称还原途径实现单一光学活性对映体的高效制备。然而, 针对具有应用价值的含有大基团、结构复杂的潜手性羰基化合物, 已知的羰基还原酶通常催化活性较低。本文综述了生物催化不对称氧化还原反应的特点和规律及其关键立体选择性羰基还原酶的性质和结构特征, 并在此基础上, 重点针对大基团手性羟基化合物的不对称合成, 总结了羰基还原酶及其催化系统开发和应用的研究进展, 并进一步提出解决该关键问题的主要发展策略。

关键词 羰基还原酶, 立体选择性, 手性羟基化合物, 不对称合成, 大基团底物

手性化合物的高效制造技术是世界各国化学工业发展的重点方向, 在很大程度上反映了一个国家制造工业的集约化程度和经济的发展水平。手性羟基类化合物是一类在手性碳上连有羟基的旋光性模块化合物。以模块化合物的结构特征为基础, 连接不同的取代基和官能团的手性羟基化合物是一类重要的中间体和多功能试剂, 包括邻羟基胺、邻二醇、羟基酸、羟基氨基酸和羟基酯等。各种手性羟基化合物以其独特的光、热和化学性质广泛应用于医药化学品、农用化学品、专用化学品、食品及功能材料行业。目前, 医药中间体中手性羟基化合物所占比例超过20%^[1]。

酶蛋白由于其自身氨基酸结构及组成的不对称性可以有效识别不同立体构型的对映异构体, 进而导致反应及产物构型的不对称性^[2]。基于生物催化的高立体选择性、区域选择性、化学选择性, 以及反应条件温和、安全性和环境相容性好等“绿色化学”可持续性技术特征, 国际上已日益关注生物催化转化手性化合物的研究并在该领域投入了大量的研究工作。针对手性化学品制造, 在38类不对称合成反应类型中已有22类采用生物催化作为主要技术手段^[3]。选择性生物催化已成为发达国家的重要科技与产业发展战略^[4]。欧洲于2016年制定了《欧洲催化科学与技术路线图》,

引用格式: 聂尧, 徐岩. 羰基还原酶及其催化不对称合成大基团手性羟基类化合物的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 595–604
Nie Y, Xu Y. Stereoselective carbonyl reductases and their roles in asymmetric synthesis of bulky chiral hydroxyl compounds (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 595–604, doi: [10.1360/N052018-00247](https://doi.org/10.1360/N052018-00247)

进一步明确了优先发展选择性催化剂的方向, 及生物催化作为标准工具的未来发展目标. 美国《2020年制造业挑战的展望》明确提出“生物制造(Biotechnology for Manufacturing)”为战略技术领域. 国际著名精细化学品和制药公司, 如Evonik, Merck, BASF, DSM, Daisel, Kaneka等, 在手性化合物制造上也纷纷引入生物催化技术并作为提升行业核心竞争力的重要手段^[5].

1 生物催化不对称还原

近年来,以氧化还原酶或其体系作为催化剂合成光学纯手性羟基化合物呈现快速发展的趋势,生物氧化还原反应可以通过立体异构去消旋反应、潜手性酮不对称还原等不同反应方式完成,导致最终产物单一对映体的关键是通过酶选择性催化还原引入手性位点^[6]。

不对称还原反应已成为制备手性羟基化合物的一类重要的反应类型^[7,8]. 立体专一性羰基还原酶能够直接针对关键手性位点催化反应, 通过不对称还原潜手性底物获得目的手性产物. 基于羰基还原酶作用底物方式的多样性, 具有不同化学结构和功能的醇类、酯类、氨基酸、环氧化合物等重要手性中间体能够分别通过不对称还原途径实现单一光学活性对映体的制备(图1). 在工业生物转化方面的统计分析发现, 已知的转化反应方式和途径中有相当一部分可归属于氧化还

原反应类型^[9]

氧化还原酶通过辅酶质子传递体现其立体选择性，其模式有4种，如图2所示，氧化型底物中具有潜手性的羰基基团有 re 面和 si 面两个非对映面，而辅酶NAD(P)H的烟酰胺环4号位碳原子上连有HR和HS两个非对映体氢原子，这两个氢原子的进攻方式决定了氧化还原酶的立体选择性，当烟酰胺环上的HR或HS进攻 re 面时，生成 S 构型手性醇，即Prelog立体选择性。相对应的，反Prelog立体选择性是指烟酰胺环上的HR或HS进攻 si 面时，生成 R 构型手性醇^[10]。

2 立体选择性羰基还原酶

羧基还原酶(carbonyl reductase)属于氧化还原酶的第一亚类^[11],又可称作酮还原酶(ketoreductase)、醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)。根据其典型的序列和结构组成特征,立体选择性羧基还原酶又分为短链脱氢酶/还原酶家族(short-chain dehydrogenases/reductases, SDRs)、中链脱氢酶/还原酶家族(medium-chain dehydrogenases/reductases, MDRs)和醛酮还原酶家族(aldo-keto reductases, AKRs)^[12]。

脱氢酶/还原酶广泛存在于各种生物体中, 早期在不对称转化中的应用涉及马肝醇脱氢酶(horse liver alcohol dehydrogenase, HLADH)和酵母醇脱氢酶(yeast alcohol dehydrogenase, YADH), 后期逐渐开发具有典

图 1 立体专一性羰基还原酶催化的不对称还原及其产物类型

Figure 1 Stereospecific carbonyl reductase-catalyzed asymmetric reduction and corresponding chiral alcohol products

图2 羰基还原酶催化的不对称还原反应方式

Figure 2 Reaction modes of carbonyl reductase-catalyzed asymmetric reduction

型催化功能的脱氢酶/还原酶, 如布氏嗜热厌氧杆菌醇脱氢酶(*Thermoanaerobium brockii* alcohol dehydrogenase, TbADH)^[13]. 其中, 短链脱氢酶/还原酶家族氨基酸序列保守性低, 最保守的特征是 α/β 折叠结构、中央 β 折叠结构以及两侧的2~3个 α -螺旋, 共同组成了用于辅酶结合的经典的Rossmann fold基序^[14]. 中链脱氢酶/还原酶含有约350个氨基酸残基^[14]. 尽管中链脱氢酶/还原酶具有较低的序列相似性, 但序列长度相似, 并且具有由辅酶结合域和含有活性中心的催化域两个典型结构域构成的保守结构(图3)^[15].

醛酮还原酶是NAD(P)H辅酶依赖型氧化还原酶超家族的成员, 目前已经在多种生物体内鉴定了150多种醛酮还原酶^[16], 包括醛糖还原酶、醛还原酶、羟基类固醇脱氢酶和二氢二醇脱氢酶等^[17]. 多数醛酮还原酶是单体蛋白, 含有约320个氨基酸残基, 大小在35 kD左右, 氨基酸序列高度相似, 且具有典型的 α/β 折叠结构, 该结构由8个平行的 β 折叠形成圆柱形核心, 外部包围着8条反向平行的 α -螺旋, β 折叠的羧基末端通过不同长度的loop结构连接到 α -螺旋的氨基末端, 而这些loop区域参与了活性位点的组成, 具有底物结合和催化反应的氨基酸残基主要定位于其中三个环上, 它们均位于 β 折叠的羧基端, 结构柔软灵活, 在二元复合物(酶/辅酶)和三元复合物(酶/辅酶/底物)中保持着不同的空间构象, 这种柔性特征使酶能够适应不同大小和形状的底物^[18]. 醛酮还原酶通常具有保守的辅酶结合位点, 包括天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和精氨酸等; 催化位点为酪氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和组氨酸组成的催化四联体, 其中酪氨酸作为质子供体, 赖氨酸和天冬氨酸形成盐桥, 同时也与酪氨酸形成氢键以促进质子的转移, 组氨酸分子则参与质子转移过程.

图3 短链脱氢酶/还原酶和中链脱氢酶/还原酶的结构组成
Figure 3 Structure profiles of short-chain dehydrogenases/reductase and medium-chain dehydrogenases/reductase

由羰基还原酶催化的酶促反应遵循顺序有序反应机制, 辅酶最先与酶结合形成全酶, 然后底物再与全酶结合后发生转化反应, 反应后最先释放的是产物, 辅酶最后与酶解离. 酶促反应过程分为两步, 首先是氢阴离子从辅酶转移到底物分子上, 然后酶活性中心的酪氨酸提供的质子转移到氧阴离子中间体上. 目前已证实活性中心附近的loop结构所发生的构象改变是辅酶结合和释放的关键因素^[18]. 此外, 辅酶的结合及其空间定位和构象在一定程度上参与了底物结合口袋的形成以及口袋的空间构型, 因此也进一步影响了酶对不同结构底物的亲和性以及最终的表现催化效率^[18].

3 羰基还原酶催化大基团底物的不对称还原

在手性羟基化合物中, 具有重要应用价值的医药中间体大多含有较大的化学基团、结构更加复杂. 芳基手性醇、手性羟基酯、杂环类手性醇等被用作合成各种重要手性药物的中间体或功能侧链(表1). 例如, 手性羟基酯用于合成 β -内酰胺类昆虫信息素、类胡萝卜素等; 光学活性3-吡咯烷醇衍生物用于合成喹诺酮、 β -内酰胺抗菌剂和钙拮抗剂等^[19]; (S)-N-苄基-3-吡咯烷醇是抗肿瘤、麻醉药、镇静剂、抗炎、抗HIV感染等活性药物中间体^[20]; (E)-2-[3-[3-[2-(7-氯-2-喹啉基)乙烯基]苯基]-3-羟基丙基]苯甲酸甲酯合成抗哮喘药孟鲁司特等^[21].

目前, 羰基还原酶催化的不对称还原研究主要局限于结构简单的小分子底物, 比如含有一个小取代基

表 1 含有大基团的手性羟基化合物及其应用

Table 1 Chiral hydroxyl compounds involving bulky groups and their applications

含有大基团的手性羟基化合物		应用
结构	名称
(<i>R</i>)-扁桃酸甲酯	半合成青霉素、头孢菌素、抗肿瘤药物、抗肥胖药物、多功能拆分剂
(<i>R</i>)-扁桃酸乙酯	合成环扁桃酸酯、氯化苯并噻唑、匹莫林等
(<i>R</i>)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯	合成赖诺普利、依那普利类ACE抑制剂
(<i>S</i>)-(-)-3-羟基-3-苯基丙酸乙酯	合成抗抑郁药物氟西汀、托莫西汀、尼索西汀中间体
(<i>S</i>)-1-苯基-3-吡咯烷醇	合成抗肿瘤、麻醉药、镇静剂、抗炎等药物中间体
(<i>S</i>)- <i>N,N</i> -二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺	合成抗抑郁药物度洛西汀中间体
(<i>E</i>)-2-[3-[3-[2-(7-氯-2-喹啉基)乙基]苯基]-3-羟基丙基]苯甲酸甲酯	合成哮喘药物孟鲁斯特中间体

的烷基芳香酮等,而且对于同一种酶,多数情况下其具有对小分子底物活性更高的趋势^[22]。然而,具有应用价值的医药中间体手性羟基化合物大多结构复杂、分子量大。基于酶三维结构的相关研究表明,羰基还原酶对大基团底物不易识别和结合^[23],底物基团或侧链与酶活性中心之间存在一定的空间位阻,从而影响了酶对大基团底物的催化性能^[24]。

3.1 芳香酮类底物的不对称还原

带有芳基的手性羟基类化合物是多种药物的手性砌块,目前已报道不同羰基还原酶用于芳香酮的不对称还原。Hummel^[25]鉴定了一种来源于短乳杆菌的醇脱氢酶(*Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase,

LBADH),用于还原带有甲基、乙基或氯甲基的烷基酮或芳基酮,基于蛋白三维结构,该酶含有一个较大的疏水口袋可以容纳底物的大取代基。此外,Naik等人^[26]评估了LBADH对几种苯乙酮衍生物的还原能力,并探究了底物分子大小对酶催化活性的影响。

*Sporobolomyces salmonicolor*羰基还原酶(*Sporobolomyces salmonicolor* carbonyl reductase, SSCR)对一系列芳基烷基酮的不对称还原活性分析表明,其对2,2,2-三甲基苯乙酮活性为0.2 U/mg, *R*构型产物光学纯度为98% e.e.;对环丙基苯基酮活性为0.57 U/mg, *R*构型产物光学纯度为96% e.e.;对环丙基4-氟苯基酮活性为0.3 U/mg, *R*构型产物光学纯度为98% e.e.^[27]。Kedziora等人^[28]利用来源于赤红球菌的醇脱氢酶(*Rhodo-*

coccus ruber alcohol dehydrogenase, ADH-A)还原2,2-二氯苯乙酮生成*R*-卤代醇, 光学纯度为97% e.e.

3.2 酮酯类底物的不对称还原

手性羟基酯被用作合成各种重要化学品的手性起始材料, 包括 β -内酰胺类昆虫信息素、类胡萝卜素等. 已有报道利用面包酵母、嗜热芽孢杆菌、放线菌和微藻类实现了一些 α -酮酯和 β -酮酯的生物还原, 具有高转化率和高立体选择性的优势^[29,30].

光学活性扁桃酸甲酯是重要的精细化工中间体和医药中间体. (*R*)-(-)-扁桃酸甲酯及其衍生物是合成环扁桃酯、羟苄唑、匹莫林等血管扩张剂、杀菌剂及镇痉剂的重要中间体^[31,32]. 筛选获得的酿酒酵母LH1具有催化还原苯甲酰甲酸甲酯的能力(图4), 在100 mmol/L底物浓度条件下, 合成(*R*)-(-)-扁桃酸甲酯产率为94.3%, e.e.值为95.0%^[31,32].

(*R*)-扁桃酸乙酯是有机合成中重要手性砌块, 是环丙烯酸酯、氢化苯并噻唑、匹莫林的合成中间体^[33]. Milagre等人^[34]利用藻酸钙纤维和双层凝胶固定的酵母细胞将苯甲酰甲酸乙酯成功还原为(*R*)-扁桃酸乙酯(图5), 产率82%.

(*R*)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯(ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutanoate, HPBE)作为血管紧张肽转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂的关键中间体, 用于合成降压药, 如西拉普利、依那普利、贝那普利、雷米普利和喹那普利^[35-38]. (*R*)-HPBE可通过2-氧代-4-苯基丁酸乙酯(ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate, OPBE)的不对称还原来制备(图6), Lacerda等人^[39]利用各种不同微生物催化还原OPBE, 其中, 酿酒酵母催化产物为(*S*)-HPBE(92% e.e.), 而马克斯克鲁维酵母合成(*R*)-HPBE(32% e.e.), 毕赤酵母能够不对称还原OPBE, 生成(*R*)-HPBE, 转化率为100%, e.e.值为81%. 此外, 利用*Candida krusei* SW2026合成(*R*)-HPBE, 底物浓度2.5 g/L, e.e.值为99.7%, 产率为95.1%^[40].

氟西汀、托莫西汀、尼索西汀是一类治疗抑郁症的重要药物, (*S*)-3-羟基-3-苯基丙酸乙酯(ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropionate, HPPE)是其合成的关键中间体, 苯甲酰基乙酸乙酯(ethyl benzoylacetate, EBA)不对称还原是合成(*S*)-HPPE的有效途径(图7)^[41,42]. Engelking等人^[43]利用*Bacillus subtilis*葡萄糖脱氢酶催化目的产物生成, 在0.5 L规模, 底物浓度55 mmol/L, 反应48 h,

图4 苯甲酰甲酸甲酯的不对称还原

Figure 4 Asymmetric reduction of methyl benzoylformate

图5 苯甲酰甲酸乙酯的不对称还原

Figure 5 Asymmetric reduction of ethyl benzoylformate

图6 2-氧代-4-苯基丁酸乙酯的不对称还原

Figure 6 Asymmetric reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate

产率为74%, e.e.值达到97%.

3.3 杂环酮类底物的不对称还原

许多生物活性分子和活性药物成分含有一个或多个哌啶环, 其中在C3位羟基引入手性可显著改变其生物活性, 手性羟基哌啶及其衍生物在制药业中发挥重要作用. 光学活性3-吡咯烷醇衍生物是用于合成许多药物的重要砌块, 例如, 喹诺酮、 β -内酰胺抗微生物剂和钙拮抗剂^[19,44]. (*S*)-*N*-苄基-3-吡咯烷醇作为活性中间体用于合成多种重要药物, 如抗肿瘤、麻醉药、镇静剂、抗炎、抗HIV感染等^[20,45]. Yamada-Onodera等人^[45]用*Geotrichum capitatum* JCM 390将1-苄基-3-吡咯烷酮还原, 生成(*S*)-*N*-苄基-3-吡咯烷醇(图8), 产率大于99.9%, e.e.值大于99%; 进一步将NAD依赖型的1-苄基-3-吡咯烷酮脱氢酶以及NADH再生的葡萄糖脱氢酶重组至大肠杆菌, 该重组菌的催化实现了同样的产率和e.e.值, 但反应时间缩短为1 h.

度洛西汀是治疗重症抑郁症、糖尿病性外周神经疼痛等疾病的重要药物, (*S*)-*N,N*-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺(*N,N*-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine, DHTP)是度洛西汀的重要合成前体^[46], 其有效合成途径之一是*N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺(*N,N*-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine,

图 7 苯甲酰基乙酸乙酯的不对称还原

Figure 7 Asymmetric reduction of ethyl benzoylacetate

图 8 1-苄基-3-吡咯烷酮的不对称还原

Figure 8 Asymmetric reduction of 1-benzyl-3-pyrrolidone

 图 9 *N,N*-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺的不对称还原

 Figure 9 Asymmetric reduction of *N,N*-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine

DKTP)的不对称还原(图9). 利用*Candida tropicalis*全细胞催化DKTP还原, 底物浓度1 g/L, 反应时间60 h, (S)-DHTP的产率88%, e.e.值达到99%^[47].

针对哮喘药孟鲁司特的复杂手性中间体的不对称合成, 20世纪后期依靠手性生物催化技术迅速崛起的美国Codexis公司开发了一系列高选择性生物催化剂, 实现孟鲁斯特钠关键中间体等复杂医药中间体的高效规模化制备^[21](图10), 并形成了关键技术垄断. 其开发的酮还原酶(ketoreductase, KRED), 催化合成孟鲁斯特钠关键中间体, 底物浓度达到100 g/L, 最大体系超过200 L, 转化率大于95%, e.e.值达到99.9%^[21].

3.4 针对大基团底物的羰基还原酶分子改造

近年来, 生物催化剂分子改造设计和定向进化技术等不断应用于现代有机合成中, 极大地推动了生物催化手性合成技术的发展. 羰基还原酶催化手性羟基化合物合成时, 大多数情况下大基团潜手性羰基化合物并非其天然最适底物^[48]. 因此, 改造野生型羰基还原酶, 提高其对大基团底物的活性和选择性, 扩展多种高附加值产品的合成能力, 获得人类所需的高效羰基还原酶具有重大的应用价值, 也是酶工程的重要挑战. 酶的底物谱的大小决定了酶在工业生产中的适用性能力. 扩展酶的底物适用范围, 使酶具有多功能的催化活力是研究的热点^[49,50].

目前, 基于酶三维结构信息的底物特异性改造, 仅需要在活性位点处进行少量的突变工作, 就可能获得底物谱显著变化的目标酶, 成为目前改造羰基还原酶以提高其对大基团底物的活性和选择性的有效方法^[22]. 基于酶三维结构分析, 针对羰基还原酶活性中心的理性设计可显著提高酶对大基团底物的活性和催

化效率. Huang等人^[51]通过理性设计改造*Candida glabrata*羰基还原酶(*Candida glabrata* ketoreductase, CgKR1), 其突变体CgKR1(F92L/F94V/I99Y/G174A)对于芳基酮酯的活性提高了7倍. Zheng等人^[52]根据分子动力学模拟分析对CgKR1底物结合口袋中的F92和F94位点进行饱和突变和组合突变, 获得的最优突变体F92C/F94W对28种具有不同官能团的底物活性提高了2~320倍. Li等人^[53]通过分子动力学模拟分析将底物分子对接于短链脱氢酶(*Empedobacter brevis* short-chain dehydrogenase/reductase, EbSDR8)的结构中, 进一步选择活性口袋内靠近底物分子的残基作为突变位点, 通过设计突变改变底物结合口袋的空间位阻效应和酶与底物之间的相互作用力, 获得的突变体G94A/S153L对底物对甲氧基苯乙酮的活性提高了10倍, 催化效率 k_{cat}/K_m 值提高了15倍.

除了基于酶结构信息的理性设计方法, 酶分子定向进化技术是又一种提高酶催化活性、拓宽底物专一性、强化立体选择性的有效途径和手段^[54]. Gong等人^[48]以羰基还原酶催化不对称合成大基团阿托伐他汀手性羟基中间体为对象, 分别从催化活性和热稳定性两个方面对羰基还原酶(*Lactobacillus brevis* ketoreductase, LbCR)进行定向进化, 基于随机突变结果进一步通过组合突变, 获得了活性和热稳定性同时提高的突变体, LbCR_{M6}(M154I/A155D/A201D/A202L)和LbCR_{M8}(M154I/A155D/V198I/A201D/A202L). 其中, 优势突变体LbCR_{M8}的催化效率提高3.2倍、40℃半衰期提高1944倍, 并用于高效合成阿托伐他汀手性羟基中间体6-氰基-(3*R*,5*R*)-二羟基己酸叔丁酯.

4 总结与展望

光学纯手性羟基化合物在医药、化工等领域有极高的应用价值, 通过生物法不对称还原羰基化合物制备高光学纯度的手性醇越来越普遍. 但总的来说, 我

图 10 孟鲁斯特钠关键中间体的高选择性生物催化合成

Figure 10 Highly stereoselective biocatalyzed synthesis of the key intermediate of Montelukast

国在手性化合物的酶法合成方面与国际手性生物催化技术的发展仍有较大差距。对于市场前景好、技术壁垒高的高附加值手性羟基类化合物产品,我国仍然缺乏“卡脖子”技术的国际核心竞争力,自主知识产权的技术和产品仍然有限。

目前,大量研究已经开发了多种立体选择性羰基还原酶,但其中大多数仅对含有小侧链如甲基或乙基的潜手性羰基底物具有活性。然而,针对具有应用价值的医药中间体,如含有大基团、结构复杂的潜手性羰基化合物,已知的羰基还原酶难以催化或催化活性较低^[55]。针对酶底物结合口袋空间构象及其与底物及辅酶等配体分子识别互作的结构功能关系研究发现,仅仅基于空间位阻扩大口袋并不能完全获得适用于相应底物类型的目标酶,活性中心位点基团和底物分子基团之间形成的氢键、离子键、疏水键、及C-H $\cdots$ π 作用等分子层面的相互作用对于酶生物大分子与小分子底物配体的结合和催化也具有显著的影响。立体选择性羰基还原酶识别大基团底物并催化合成手性羟基产物单一对映体的关键科学问题在于,如何基于结构

认知探究立体选择性羰基还原酶与大侧链基团底物及反应必需辅酶等配体分子之间的选择性识别和作用机制,并在此基础上针对目标反应进一步有效调控酶的催化性能。因此,针对立体选择性羰基还原酶催化潜手性羰基化合物的不对称还原反应,需要以调控天然羰基还原酶对大基团底物催化困难的缺陷作为出发点,基于具有催化大基团底物活性潜力的羰基还原酶,采用新型生物信息学和分子模拟相结合的功能酶基因探矿方法,挖掘适用于芳基酮、酮酯、杂环类大基团底物的新酶^[56];基于底物广谱性表征,从序列-结构-功能等角度系统比较和分析底物分子结构与选择性之间的关系,解析羰基还原酶选择性识别大基团底物及其催化不对称还原的分子机制^[22];基于序列-结构-功能三者之间的内在关系和底物结构对酶催化性能的影响规律及酶结构功能的共进化关系,结合酶蛋白质分子从头设计方法(*de novo design*),建立调控选择性识别和催化不同基团结构底物的精准分子设计策略^[57],从而进一步拓展和强化立体选择性羰基还原酶的催化性能和工业应用属性。

参考文献

- McCoy M. Business concentrates: Johnson Matthey buys biocatalysis company. *Chem Eng News*, 2010, 88: 20
- Hartwig J. Recipes for excess. *Nature*, 2005, 437: 487–488
- Thayer A M. Enzymes at work. *Chem Eng News*, 2006, 84: 15–25
- Schmid A, Dordick J S, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409: 258–268
- Thayer A M. Biocatalysis helps reach a resolution. *Chem Eng News*, 2006, 84: 29–31
- Hall M, Bommaris A S. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. *Chem Rev*, 2011, 111: 4088–4110
- Noyori R. Asymmetric catalysis: Science and opportunities (nobel lecture). *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 2008–2022
- Kroutil W, Mang H, Edegger K, et al. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8: 120–126
- Schoemaker H E, Mink D, Wubolts M G. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 299: 1694–1697
- Matsuda T, Yamanaka R, Nakamura K. Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2009, 20: 513–557

- 11 Hummel W. Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: Recent developments. *Trends Biotech*, 1999, 17: 487–492
- 12 Hollmann F, Arends I W C E, Holtmann D. Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chem*, 2011, 13: 2285–2314
- 13 Pennacchio A, Giordano A, Pucci B, et al. Biochemical characterization of a recombinant short-chain NAD(H)-dependent dehydrogenase/reductase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles*, 2010, 14: 193–204
- 14 Kavanagh K L, Jörnvall H, Persson B, et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 3895–3906
- 15 Knoll M, Pleiss J. The Medium-chain dehydrogenase/reductase engineering database: A systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence-structure-function relationship. *Protein Sci*, 2008, 17: 1689–1697
- 16 Hyndman D, Bauman D R, Heredia V V, et al. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biol Interact*, 2003, 143-144: 621–631
- 17 Jez J M, Bennett M J, Schlegel B P, et al. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J*, 1997, 326: 625–636
- 18 Couture J F, Legrand P, Cantin L, et al. Loop relaxation, a mechanism that explains the reduced specificity of rabbit 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase, a member of the aldo-keto reductase superfamily. *J Mol Biol*, 2004, 339: 89–102
- 19 Kizaki N, Yasohara Y, Nagashima N, et al. Characterization of novel alcohol dehydrogenase of *Devosia riboflavina* involved in stereoselective reduction of 3-pyrrolidinone derivatives. *J Mol Catal B-Enzym*, 2008, 51: 73–80
- 20 Yamada-Onodera K, Kojima K, Takase Y, et al. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of gene encoding N-benzyl-3-pyrrolidinol dehydrogenase from *Geotrichum capitatum*. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104: 379–384
- 21 Liang J, Lalonde J, Borup B, et al. Development of a biocatalytic process as an alternative to the (–)-DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast. *Org Proc Res Dev*, 2009, 14: 193–198
- 22 Nie Y, Wang S, Xu Y, et al. Enzyme engineering based on X-ray structures and kinetic profiling of substrate libraries: alcohol dehydrogenases for stereospecific synthesis of a broad range of chiral alcohols. *ACS Catal*, 2018, 8: 5145–5152
- 23 Lavandera I, Kern A, Ferreira-Silva B, et al. Stereoselective bio-reduction of bulky-bulky ketones by a novel ADH from *Ralstonia* sp.. *J Org Chem*, 2008, 73: 6003–6005
- 24 Athanasiou N, Smallridge A J, Trewella M A. Baker's yeast mediated reduction of β -keto esters and β -keto amides in an organic solvent system. *J Mol Catal B-Enzym*, 2001, 11: 893–896
- 25 Hummel W. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *New Enzym Org Syn*, 1997, 58: 145–184
- 26 Naik H G, Yeniad B, Koning C E, et al. Investigation of asymmetric alcohol dehydrogenase (ADH) reduction of acetophenone derivatives: Effect of charge density. *Org Biomol Chem*, 2012, 10: 4961–4967
- 27 Zhu D, Hua L. Enantioselective enzymatic reductions of sterically bulky aryl alkyl ketones catalyzed by a NADPH-dependent carbonyl reductase. *J Org Chem*, 2006, 71: 9484–9486
- 28 Kędziora K, Díaz-Rodríguez A, Lavandera I, et al. Laccase/TEMPO-mediated system for the thermodynamically disfavored oxidation of 2,2-dihalo-1-phenylethanol derivatives. *Green Chem*, 2014, 16: 2448–2453
- 29 Ishihara K, Kato C, Yamaguchi H, et al. Stereoselective reduction of carbonyl compounds with actinomycete: purification and characterization of three α -keto ester reductases from *Streptomyces avermitilis*. *Biosci Biotech Biochem*, 2008, 72: 3249–3257
- 30 Yamaguchi H, Nakajima N, Ishihara K. Purification and characterization of two α -keto ester reductases from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271. *Biosci Biotech Biochem*, 2002, 66: 588–597
- 31 Yadav G D, Sajgure A D, Dhoot S B. Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of *RS*($\pm$)-methyl mandelate. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83: 1145–1153
- 32 Guo J L, Mu X Q, Xu Y. Integration of newly isolated biocatalyst and resin-based *in situ* product removal technique for the asymmetric synthesis of (*R*)-methyl mandelate. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33: 797–804
- 33 Kasprzak J, Rauter M, Denter S, et al. Synthesis of ethyl (*R*)-mandelate using recombinant carboxydotherrus hydrogenofomans alcohol dehydrogenase produced by two yeast species. *J Mol Catal B-Enzym*, 2016, 133: 176–186
- 34 Milagre H M S, Milagre C D F, Moran P J S, et al. Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor. *Enzyme Microbial Tech*, 2005, 37: 121–125
- 35 Nikaido T, Matsuyama A, Ito M, et al. Stereospecific reduction of 2-oxo-4-phenylbutanoate to (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate with microbial cells. *Biosci Biotech Biochem*, 2014, 56: 2066–2067
- 36 de Lacerda P S B, Ribeiro J B, Leite S G F, et al. Microbial reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate. Searching for *R*-enantioselectivity. *New*

- access to the enalapril like ACE inhibitors. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2006, 17: 1186–1188
- 37 Ni Y, Li C X, Ma H M, et al. Biocatalytic properties of a recombinant aldo-keto reductase with broad substrate spectrum and excellent stereoselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 89: 1111–1118
 - 38 Oda S, Inada Y, Kobayashi A, et al. Production of ethyl (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate via reduction of ethyl 2-*oxo*-4-phenylbutanoate in an interface bioreactor. *Biosci Biotech Biochem*, 2014, 62: 1762–1767
 - 39 Lacerda P S B, Ribeiro J B, Leite S G F, et al. Microbial enantioselective reduction of ethyl-2-*oxo*-4-phenyl-butanoate. *Biochem Eng J*, 2006, 28: 299–302
 - 40 Zhang W, Ni Y, Sun Z, et al. Biocatalytic synthesis of ethyl (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate with *Candida krusei* SW2026: A practical process for high enantiopurity and product titer. *Process Biochem*, 2026, 44: 1270–1275
 - 41 Ou Z, Chen X, Ying G, et al. Continuous preparation of (*S*)-3-hydroxy-3-phenylpropionate by asymmetric reduction of 3-*oxo*-3-phenylpropionic acid ethyl ester with *Saccharomyces cerevisiae* CGMCC No.2266 in a membrane reactor. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16: 320–326
 - 42 Wang P Y, Tsai S W. Hydrolytic resolution of (*R,S*)-3-hydroxy-3-phenylpropionates by esterase from *Klebsiella oxytoca*: Effects of leaving alcohol, covalent immobilization and aqueous pH. *J Mol Catal B-Enzymatic*, 2009, 59: 70–75
 - 43 Engelking H, Pfaller R, Wich G, et al. Reaction engineering studies on β -ketoester reductions with whole cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Tech*, 2006, 38: 536–544
 - 44 Chen J, Yan M, Xu L. Efficient synthesis of (*S*)-*N*-Boc-3-hydroxypiperidine using an (*R*)-specific carbonyl reductase from *Candida parapsilosis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33: 61–72
 - 45 Yamada-Onodera K, Fukui M, Tani Y. Purification and characterization of alcohol dehydrogenase reducing *N*-benzyl-3-pyrrolidinone from *Geotrichum capitatum*. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103: 174–178
 - 46 Liu H, Hoff B H, Anthonsen T. Chemo-enzymatic synthesis of the antidepressant duloxetine and its enantiomer. *Chirality*, 2000, 12: 26–29
 - 47 Soni P, Banerjee U C. Biotransformations for the production of the chiral drug (*S*)-duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67: 771–777
 - 48 Gong X M, Qin Z, Li F L, et al. Development of an engineered ketoreductase with simultaneously improved thermostability and activity for making a bulky atorvastatin precursor. *ACS Catal*, 2019, 9: 147–153
 - 49 Liu Z Q, Wu L, Zhang X J, et al. Directed evolution of carbonyl reductase from *Rhodospiridium toruloides* and its application in stereoselective synthesis of *tert*-butyl (3*R,S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 3721–3729
 - 50 Xu G C, Shang Y P, Yu H L, et al. Identification of key residues in *Debaryomyces hansenii* carbonyl reductase for highly productive preparation of (*S*)-aryl halohydrins. *Chem Commun*, 2015, 51: 15728–15731
 - 51 Huang L, Ma H M, Yu H L, et al. Altering the substrate specificity of reductase Cg KR1 from *Candida glabrata* by protein engineering for bioreduction of aromatic α -keto esters. *Adv Synth Catal*, 2014, 356: 1943–1948
 - 52 Zheng G W, Liu Y Y, Chen Q, et al. Preparation of structurally diverse chiral alcohols by engineering ketoreductase Cg KR1. *ACS Catal*, 2017, 7: 7174–7181
 - 53 Li A, Ye L, Yang X, et al. Reconstruction of the catalytic pocket and enzyme-substrate interactions to enhance the catalytic efficiency of a short-chain dehydrogenase/reductase. *ChemCatChem*, 2016, 8: 3229–3233
 - 54 Qu G, Zhang K, Jiang Y, et al. The Nobel Prize in Chemistry 2018: the directed evolution of enzyme and the phage display technologies (in Chinese). *J Biol*, 2019, 36: 1–6, 19 [曲戈, 张锐, 蒋迎迎, 等. 2018诺贝尔化学奖: 酶定向进化与噬菌体展示技术. 生物学杂志, 2019, 36: 1–6, 19]
 - 55 Parkot J, Gröger H, Hummel W. Purification, cloning, and overexpression of an alcohol dehydrogenase from *Nocardia globerula* reducing aliphatic ketones and bulky ketoesters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86: 1813–1820
 - 56 Liang C, Nie Y, Mu X, et al. Gene mining-based identification of aldo-keto reductases for highly stereoselective reduction of bulky ketones. *Bioresour Bioprocess*, 2018, 5: 33
 - 57 Li R, Wijma H J, Song L, et al. Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 664–670

Stereoselective carbonyl reductases and their roles in asymmetric synthesis of bulky chiral hydroxyl compounds

NIE Yao & XU Yan

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Chiral hydroxyl compounds have been widely used in pharmaceutical, agrochemical, fine chemicals, and functional materials industries, due to their unique physical and chemical properties. Stereoselective carbonyl reductases can be efficiently applied to catalyze asymmetric synthesis of chiral hydroxyl compounds with high optical purity from directed reduction of prochiral carbonyl group of the corresponding keto substrates. Based on the diversity of substrates, single enantiomers of various chiral hydroxyl compounds, including chiral alcohols, hydroxyl esters, and hydroxyl amino acids, can be prepared through carbonyl reductase-catalyzed asymmetric reduction in a high efficiency. However, most of the available carbonyl reductases only exhibit low activity towards the substrates involving bulky groups. This review summarizes the basic traits and principles of biocatalytic asymmetric oxidoreductions, and the key characteristics and structure-function relationship of stereoselective carbonyl reductases. In addition, the carbonyl reductases and their systems for asymmetric synthesis of bulky chiral hydroxyl compounds are also addressed, and the potential strategies targeting the critical issue are further discussed.

carbonyl reductase, stereoselectivity, chiral hydroxyl compounds, asymmetric reduction, bulky substrate

doi: [10.1360/N052018-00247](https://doi.org/10.1360/N052018-00247)