



专论与综述

内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶不对称合成非天然手性 D-氨基酸的研究进展

程新宽 殷利眷 任思羽 彭磊 姚远 马龙*

天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室
天津 300457

摘要: 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶不对称合成非天然的手性 D-氨基酸是目前生物催化领域的研究热点。内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶具有优良的立体选择性, 利用其进行酶催化不对称合成光学纯的手性 D-氨基酸, 被广泛用于医药、食品、化妆品、精细化学品等领域。为了促进生物催化法在合成手性 D-氨基酸方向的进一步发展, 本文对内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶催化合成 D-氨基酸的现状进行了综述。重点介绍了 *Corynebacterium glutamicum*、*Ureibacillus thermosphaericus*、*Symbiobacterium thermophilum* 来源的内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶在新酶的挖掘、催化性能、晶体结构解析、分子改造、功能与催化机制、合成 D-氨基酸新途径等方面的研究进展, 并对内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶的未来研究方向及策略进行了展望。本综述将进一步加深人们对内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶的认识, 也为具有挑战性的生物合成任务提供信息借鉴。

关键词: 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶, 生物催化, D-氨基酸

Meso-diaminopimelate dehydrogenase for asymmetric synthesis of unnatural chiral D-amino acids: a review

CHENG Xin-Kuan YIN Li-Juan REN Si-Yu PENG Lei YAO Yuan MA Long*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology; College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Asymmetric synthesis of unnatural chiral D-amino acids is a research hotspot, using *meso*-diaminopimelate dehydrogenase, in the field of biocatalysis. *Meso*-diaminopimelate dehydrogenase has excellent stereoselectivity, and it was used for enzymatic asymmetric synthesis of optically pure chiral D-amino acids, which is widely applied in medicine, food, cosmetics, fine chemicals field. To efficiently synthesize chiral D-amino acids, the methods of biocatalysis should be further developed. In this review, the research status was introduced about the synthesis of D-amino acids catalyzed by *meso*-diaminopimelate

Foundation items: Tianjin Education Commission Scientific Research Project (2019KJ239); National Natural Science Foundation of China (21672161); Tianjin Science and Technology Committee Project (18PTSYJC00140)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60602298; E-mail: malong@tust.edu.cn

Received: 28-02-2020; **Accepted:** 06-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 天津市教委科研计划(2019KJ239); 国家自然科学基金(21672161); 天津市科学技术委员会项目(18PTSYJC00140)

*通信作者: Tel: 022-60602298; E-mail: malong@tust.edu.cn

收稿日期: 2020-02-28; **接受日期:** 2020-05-06; **网络首发日期:** 2020-06-04

dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*, *Symbiobacterium thermophilum*, *Ureibacillus thermosphaericus*. It focuses on research progress of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase in mining of new enzyme, catalytic performance, crystal structure, molecular modification, function and catalytic mechanism, new way of synthesizing D-amino acid, etc. Finally, this paper prospected the future research directions and strategies for *meso*-diaminopimelate dehydrogenase. Therefore, this review has deepened our understanding of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase, and it also provides guidance and information for challenging biosynthetic tasks.

Keywords: *Meso*-diaminopimelate dehydrogenase, Biocatalysis, D-amino acid

D-氨基酸由于其药物中间体、功能食品、调味料、化妆品和精细化学品等工业生产中的关键作用而受到越来越多的关注^[1-4]。目前 D-氨基酸的主要应用包括：D-苯丙氨酸作为抗糖尿病药物那格列奈的重要手性合成原料^[5]；D-对羟基苯甘氨酸是青霉素、头孢、阿莫西林等半合成抗生素的重要前体^[6-7]；D-苯甘氨酸也是半合成类抗生素和放线菌肽类抗生素(链霉菌素和万古霉素)的重要前体^[8-10]；D-色氨酸是治疗勃起功能障碍药物他达拉非的关键中间体^[11-12]；D-丙氨酸是二肽类甜味剂阿力甜的重要组成成分^[13]；D-叔亮氨酸可用于合成抗病毒、抗肿瘤及抗炎症等药物^[14]；D-天冬氨酸的抗氧化和促进胶原蛋白生成作用、D-谷氨酸修复皮肤疤痕的作用、D-丝氨酸减少紫外线对皮肤的伤害作用,均让他们成为水包油类乳液化妆品中的重要功能成分^[15]。D-氨基酸的合成方法主要有化学法和生物法(包括酶催化法和发酵法)。合成方法中最具有开发潜力和优势的就是生物酶催化法,这不仅因为生物酶催化法拥有绿色节能环保、反应条件温和等特点,还因为其催化产物选择性强、操作简便、无需调控复杂代谢网络的优势。

在生物酶法合成手性氨基酸的发展史上,以 L-氨基酸的发展最为成熟。截至目前,已经有多种

NAD(P)⁺依赖型的 L-氨基酸脱氢酶被发现,其可以有效地被用于 L-氨基酸及其类似物的生物催化合成,并成功应用于工业化生产当中^[16-19]。相比之下,由于自然界中尚未发现同样高效的 D-氨基酸脱氢酶,因此,与之类似的生物技术还无法利用 D-氨基酸脱氢酶来实现。正是由于自然界中 D-氨基酸脱氢酶的稀有性,并且已经发现的 D-氨基酸脱氢酶大部分属于难以纯化的膜蛋白^[20-21],加之其只能催化 D-氨基酸氧化脱氨生成对应的 α -酮酸而无法催化对应的 α -酮酸还原胺化生成对应的 D-氨基酸^[22],因此,对于酶法合成 D-氨基酸寻找其他类型的酶成为了一种更有效的途径。这些酶主要包括：D-海因酶、氧化还原酶、D-氨基转移酶、青霉素 G 酰化酶、腈水解酶、氨基酸消旋酶、D-氨基转氨酶、L-氨基酸氧化酶、N-乙酰-D-氨基酸水解酶等等^[4,23-26]。但这些酶或多或少均存在选择性差、活性低、需要化学试剂参与、底物昂贵、存在副产物、转化率和产率低等不足。相比较而言,内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶(DAPDH; EC 1.4.1.16)具有明显优势,因为其能够可逆并且选择性地催化天然底物内消旋-二氨基庚二酸的 D-型中心氧化脱氨,生成对应的 L-2-氨基-6-氧代庚二酸(图 1)^[27]。这就为 D-氨基酸的酶法合成建立了良好的基础。

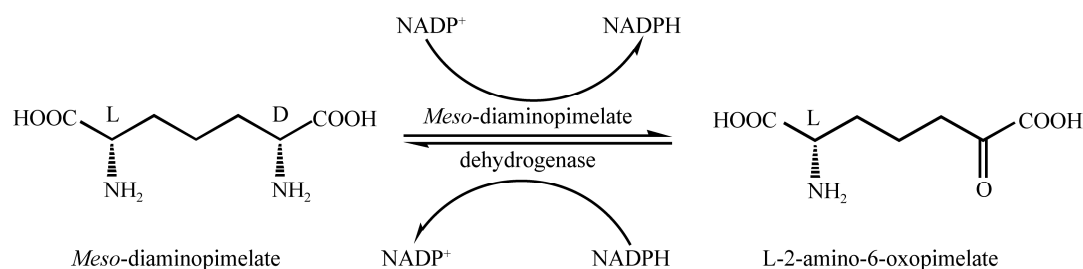


图 1 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶催化天然底物内消旋-二氨基庚二酸的反应

Figure 1 The catalytic reaction of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase against natural substance *meso*-diaminopimelate

DAPDH 是一类 NADP^+ 依赖型的氧化还原酶, 主要存在于生物体内的赖氨酸合成途径中, 广泛分布于谷氨酸棒杆菌、球形芽孢杆菌、短杆菌属、肠杆菌属、植物大豆、分枝杆菌等生物体内^[28-31]。目前已报道的 DAPDH, 根据遗传进化关系以及结构与功能的解析, 可以分为两个亚类: I 类 DAPDH 对其天然底物内消旋-二氨基庚二酸(*meso*-DAP)表现出更明显的底物偏好性, II 类 DAPDH 具有更广泛的底物谱, 除了天然底物外, 还对部分 2-酮酸表现出天然的还原胺化活力(图 2)^[32]。尽管如此, 科研界对 DAPDH 及其作为生物催化剂合成 D-氨基酸的研究仍然不足, 这严重限制了 D-氨基酸的生物酶催化法的发展。因此, 本综述从酶的挖掘、

性质研究、结构解析和分子改造等方面, 系统地介绍了 DAPDH 用于 D-氨基酸酶法合成的发展史, 以期 D-氨基酸的酶法合成领域提供信息参考, 推进 D-氨基酸酶法合成的工业化进程。

1 *Corynebacterium glutamicum* 来源的 DAPDH (CgDAPDH)

1976 年, 内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶第一次在 *Bacillus sphaericus* 中^[33]被挖掘确认。随后 30 年的研究主要围绕 DAPDH 其他来源新酶的发现、酶学性质的研究、晶体结构的解析等方面进行^[34-37], 尽管 DAPDH 本身的催化特点已被科研工作者所熟知, 但当时该酶的研究还未深入到 D-氨基酸的合成。直到 2006 年, 来自美国的科研工作者^[38]将

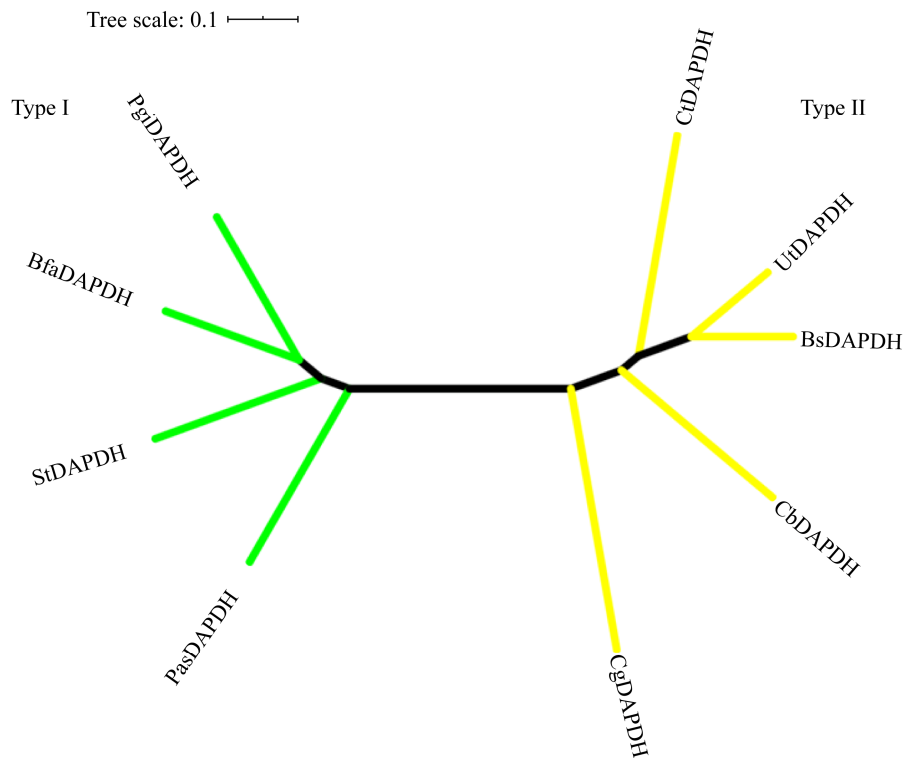


图 2 DAPDH 家族的遗传进化图谱

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of DAPDH family

注: CbDAPDH 来源于 *Clostridium bolteae* 90A9, CtDAPDH 来源于 *Clostridium tetani* E88, PasDAPDH 来源于 *Porphyromonas asaccharolytica* DSM 20707, BfaDAPDH 来源于 *Bacteroides faecis* MAJ27, PgiDAPDH 来源于 *Porphyromonas gingivalis* W83, BsDAPDH 来源于 *Bacillus sphaericus*, CgDAPDH 来源于 *Corynebacterium glutamicum*, UtDAPDH 来源于 *Ureibacillus thermosphaericus*, StDAPDH 来源于 *Symbiobacterium thermophilum*.

Note: *Clostridium bolteae* 90A9 (CbDAPDH), *Clostridium tetani* E88 (CtDAPDH), *Porphyromonas asaccharolytica* DSM 20707 (PasDAPDH), *Bacteroides faecis* MAJ27 (BfaDAPDH), *Porphyromonas gingivalis* W83 (PgiDAPDH), *Bacillus sphaericus* (BsDAPDH), *Corynebacterium glutamicum* (CgDAPDH), *Ureibacillus thermosphaericus* (UtDAPDH), *Symbiobacterium thermophilum* (StDAPDH).

C. glutamicum 来源的 DAPDH 基因利用定向进化技术, 通过两轮易错 PCR 和活性中心的定点饱和突变, 获得一株 CgDAPDH 的突变体 BC621 (Gln151Leu、Asp155Gly、Thr170Ile、Arg196Met、His245Asn), 其表达产物成为了第一个广底物谱、高立体选择性合成 D-氨基酸的催化剂, 对环己基丙酮酸的活性最高, 是野生型的 625 倍; 这是首次将 DAPDH 改造为 D-氨基酸脱氢酶的案例, 该酶可以高效地催化 α -酮酸和氨进行还原胺化, 生成对应的 D-氨基酸(图 3)。

随后, 来自英国曼彻斯特大学的 Nicholas J. Turner 团队充分挖掘了 CgDAPDH 合成 D-氨基酸的潜力: 他们从 4-溴肉桂酸和 4-溴苯基丙酮酸出发, 分别使用苯丙氨酸氨裂合酶和 CgDAPDH/BC621 催化反应, 获得了 4-溴苯丙氨酸的 L 和 D 两个对映异构体后, 再与一组芳基硼酸偶联, 获得对应的非天然 L 和 D 联芳基丙氨酸^[39]。然而这种方法的缺陷是苯丙氨酸氨裂合酶的产率很低, 进而影响 CgDAPDH 催化合成 D-氨基酸的效率, 并且需要化学还原剂的参与。因此, Nicholas J. Turner 团队对该催化路线进行了改进, 用 CgDAPDH 和葡萄糖脱氢酶偶联并构建成细胞工厂, 该细胞工厂可以催化芳香族 α -酮酸转化为对应的 D-氨基酸, 成功实现了对不同取代侧链 D-芳基丙氨酸的高效合成 ($ee \geq 98\%$, 产量可以达到 200 mg)^[40]。尽管后续 Nicholas J. Turner 团队又尝试偶联 L-氨基酸转氨酶和 D-氨基酸转氨酶催化 L-苯丙氨酸/DL-苯丙氨酸来合成 D-苯丙氨酸及其衍生物^[5], 但是 D-氨基酸转氨酶具有需要昂贵的氨基供体以及会产生多余的副产物等缺陷, 导致这种反应的催化效率明显

低于 CgDAPDH 主导型。因此, 这也间接凸显了 DAPDH 在酶法合成 D-氨基酸方面的优势。不过, 尽管 CgDAPDH 是第一个人造 D-氨基酸脱氢酶, 但其并不完美, 尤其在热稳定性和催化活力方面, 这也促进了其他来源 DAPDH 的挖掘和研究。

2 *Ureibacillus thermosphaericus* 来源的 DAPDH

受 CgDAPDH 研究的启发, 2011 年来自日本的研究团队从不同的样品中尝试筛选新型的 DAPDH, 最终从日本堆肥中分离出 *U. thermosphaericus* 菌株 A1, 并从中确认了第一个新型耐热菌来源的 UtDAPDH^[41], 为生物酶法一步合成 D-氨基酸提供了基础平台。随后该团队以此平台为基础, 参考 2006 年美国科研团队将 CgDAPDH 改造为 D-氨基酸脱氢酶的位点, 在 UtDAPDH 中依次进行相同保守位点和相同氨基酸的突变改造 (Gln154Leu、Asp158Gly、Thr173Ile、Arg199Met、His249Asn), 并成功将 UtDAPDH 改造为具有热稳定性(最高耐热温度为 65 °C)的 $NADP^+$ 依赖型 D-氨基酸脱氢酶^[42], 改造后的酶成功实现了 D-异亮氨酸、D-2-氨基辛酸、D-赖氨酸等 D-氨基酸的氧化脱氨和 2-氧代辛酸、2-氧代己酸等 α -酮酸的还原胺化生成对应 D-氨基酸的反应, 但其无论是催化活力还是可催化底物的范围均有限。因此, 为了进一步合成不同构型的 D-氨基酸, 该团队又借助 UtDAPDH 偶联葡萄糖脱氢酶(用于辅酶再生)用于支链 D-氨基酸的合成, 并首次成功实现了酶法合成稳定同位素标记的 D-支链氨基酸(D-[1-¹³C, ¹⁵N]亮氨酸、D-[1-¹³C]亮氨酸、D-[¹⁵N]亮氨酸、D-[¹⁵N]异亮氨酸和 D-[¹⁵N]缬氨酸)^[43]。这为 D-氨基酸及

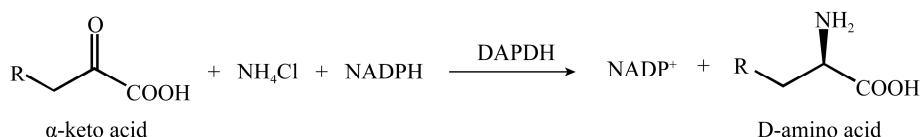


图 3 α -酮酸和氨被 DAPDH 催化生成 D-氨基酸

Figure 3 α -keto acid and ammonia are catalyzed by DAPDH to generate D-amino acid

其衍生物的多种示踪研究提供了借鉴基础。同时, 为了方便 D-氨基酸的检测分析, 研究者以 D-异亮氨酸为先例, 在 UtDAPDH 催化 D-氨基酸反应时, 辅酶由 NADP^+ 转化为 NADPH, 而后者可以被化学试剂转化为水溶性的四氮唑-3, 这样就可以通过吸光值检测 D-异亮氨酸^[44]。此检测方法的建立可以大大加快 D-氨基酸的检测速度, 并且避免了气相色谱和高效液相色谱等昂贵仪器的使用。

2015 年 UtDAPDH 的蛋白质晶体结构得到成功解析^[45], 为 UtDAPDH 的蛋白质工程改造打下了良好基础。日本的研究团队借助解析的蛋白质晶体结构为依托, 通过对结构信息的分析, 利用半理性设计和定向进化手段, 获得了 C 端去除 His 标签的 UtDAPDH, 这种没有 C 端 His 标签的酶无论是在还原胺化还是在氧化脱氨方向都表现出极高的酶催化活力, 并首次在 DAPDH 家族中发现 C 端 His 标签阻碍酶催化活力的现象; 随后又在此基础上获得了 D94A 的突变体, 对大位阻底物苯丙酮酸(对应 D-苯丙氨酸), 突变体的比活力提高了 8 倍, 达到了 16 U/mg, 对 2-氧代辛酸和 2-氧代己酸两个直链 α -酮酸底物的催化活力也分别提高了 4.9 倍和 3.8 倍, 而后的晶体结构解析表明, 底物口袋的扩大和增加底物结合口袋的疏水性是突变体酶活提高的原因^[46]。这些研究均为分析 DAPDH 家族在催化过程中结构与功能之间的关系提供了借鉴, 也将 DAPDH 进化为更加高效的人造 D-氨基酸脱氢酶又推进了一步。

3 *Symbiobacterium thermophilum* 来源的 DAPDH

在国外同行开展研究的同时, 国内的科研工作者也对 D-氨基酸的酶法合成进行了探索并取得了一定的成绩。首先是来自中国科学院天津工业生物技术研究所的朱敦明和吴洽庆研究团队, 于 2012 年利用基因挖矿手段^[47-49]发现了一种新型的来自 *S. thermophilum* 的 DAPDH (StDAPDH), 将

其克隆表达后, 对纯化的酶进行性质研究并应用于合成 D-氨基酸。这是目前发现的第一个具有催化 D-氨基酸活性的天然 DAPDH (I 类), 尤其能够还原胺化丙酮酸生成 D-丙氨酸(转化率>99%, $ee>99\%$), 也是截至目前发现的热稳定性最好的 DAPDH (70 °C 孵育 1 h 依然保持 94% 的酶活力)^[50]。随后, 为了增大 StDAPDH 的底物结合口袋, 使其可以容纳较大的底物苯丙酮酸, 研究者将 CgDAPDH 和 StDAPDH 的氨基酸序列进行同源比对, 因为前者拥有晶体结构, 由此推算出 StDAPDH 中天然底物 *Meso*-DAP 的 L 中心周围的氨基酸(Phe146、Thr171、Arg181、His227), 并对这些氨基酸进行定点饱和突变, 最终获得突变体 H227V, 其相比野生型对苯丙酮酸的比活力提高了 35.1 倍^[51]。

尽管经过蛋白质工程改造以后, StDAPDH 催化合成 D-氨基酸的效率极大提高, 但是没有晶体结构作为指导, 无疑为 StDAPDH 进一步的改造工作增加了很大的不确定性和难度。于是, 在 2014 年, 有研究者解析了来源于 *S. thermophilum* 的 DAPDH 的晶体结构^[52], 不仅为后续酶的改造工作提供了信息借鉴, 而且加深了对催化机理的认识。3 种不同形式的晶体结构(单体酶、酶与辅酶 NADP^+ 、酶与 NADPH 以及 *meso*-DAP)可以满足后续各种基于结构的改造工作。因此, 对于之前不能有效催化的大位阻 α -酮酸, 例如: 苯甲酰甲酸、2-氧代-4-苯基丁酸、吡啶-3-丙酮酸, 在参考已解析蛋白质晶体结构的基础上, 研究者借助半理性设计^[53-55]、活性位点组合饱和突变(combinatorial active-site saturation test, CASTing)^[56-57]、迭代饱和突变(iterative saturation mutagenesis, ISM)^[58-59]等技术手段, 对 DAPDH 进行了定向改造, 获得了一种高催化效率的 DAPDH 突变体(W121L/H227I), 该突变体成功实现了多个大位阻 α -酮酸转化为对应 D-氨基酸的催化过程(图 4)^[60]。这也为进行更具挑战性 D-氨基酸的合成工作提供了借鉴。

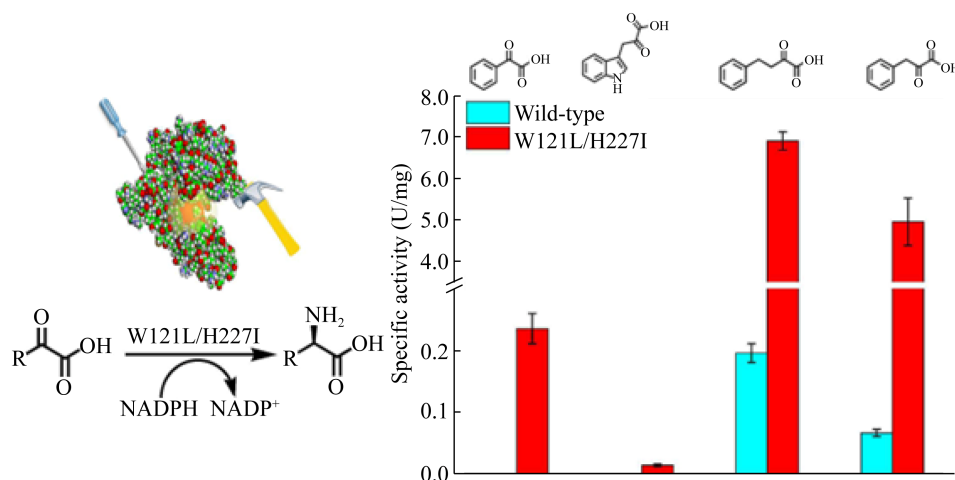


图4 结构指导重塑 StDAPDH 的底物结合口袋用于还原胺化大位阻 α -酮酸^[60]

Figure 4 Structure-guided engineering of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase for enantioselective reductive amination of sterically bulky α -keto acids^[60]

由于 DAPDH 属于氧化还原酶,因此不可避免地需要用到辅酶,StDAPDH 是 NADP^+ -NADPH 依赖型,而辅酶的使用又是工业催化领域一个急需克服的高成本问题。所以,尝试解决辅酶的高成本问题是一个重要研究方向。众所周知,辅酶 NAD(H) 相比 NADP(H) 有稳定性好、价格低廉及更广的辅酶循环方法等优势^[61],所以将 StDAPDH 的辅酶依赖型由 NADP(H) 改为 NAD(H),是一个很有应用前景的措施。辅酶 NAD(H) 和 NADP(H) 的主要区别在于腺嘌呤的 2' 位上,后者在该位置上多连接了一个磷酸基团(图 5)^[62]。

研究者选择与辅酶 NADP^+ 上磷酸基团有直接相互作用的 Arg35 和 Arg36 作为改造位点,同时依据同类辅酶改造经验^[63-64],推断靠近辅酶腺嘌呤的氨基酸残基 Tyr76 也可能影响辅酶的偏好性,对 3 个位点进行定点突变后成功实现了辅酶偏好性由 NADP(H) 反转为 NAD(H)^[62]。需要说明的是,辅酶的反转还是需要用到辅酶循环系统才能让辅酶的成本最大限度地降低,而用到辅酶循环系统就需要借助另一个协同酶,这种用来循环辅酶的协同酶与 DAPDH 之间的催化协同性以及共同催化的稳定性是生物催化过程中又一个需要考虑的问题。因此,研究人员将 StDAPDH 和来源于 *Candida*

boidinii 的甲酸脱氢酶进行了共固定化的研究,并对固定化和生物转化条件进行优化,结果显示 12 个批次的重复使用后依然保持了双酶 80% 的酶活力,进行 20 个批次的循环反应后, D-丙氨酸依然可以有效合成(分离产率=75.7%, $ee=99.5\%$)^[65]。这种共固定化酶不仅提高了双酶的稳定性和可重复利用性,还有助于缩短协同反应之间中间产物的转移距离,具有提高反应催化效率的潜力。

前面的研究均是针对 α -酮酸进行不对称还原胺化生成对应的 D-氨基酸,如果可以利用更加容易获得的 L-氨基酸为底物合成对应的 D-氨基酸,那无疑会为 D-氨基酸的合成打开另一条通路。因此,研究人员尝试了以 L-苏氨酸为底物,利用体外合成生物学的方法,借助 L-苏氨酸氨裂解酶、StDAPDH、甲酸脱氢酶三酶级联催化反应实现 L-

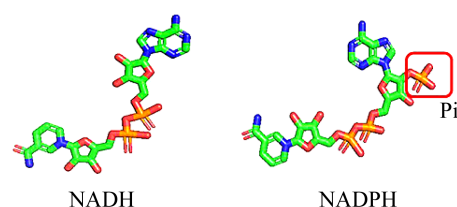


图5 辅酶 NADH 与 NADPH 结构上的区别

Figure 5 Structural differences between coenzyme NADH and NADPH

苏氨酸转化为 D-2-氨基丁酸(产率>90%, *ee*>99%), 并且无需添加外源氨基供体, 副产物只有二氧化碳和水(图 6)^[66]。这为合成生物学与 D-氨基酸酶法合成的完美结合开启了新的篇章。

受此启发, 江南大学的徐岩和聂尧团队利用 L-氨基酸脱氢酶和 StDAPDH 以及甲酸脱氢酶, 同样利用合成生物学的方法构建了一套以 L-氨基酸为起始底物, 一锅合成 D-氨基酸的工艺, L-氨基酸脱氢酶催化 L-苯丙氨酸氧化脱氨生成苯丙酮酸, 生成的苯丙酮酸被 StDAPDH/H227V 还原胺化生成对应的 D-苯丙氨酸, 甲酸脱氢酶用于催化过程中辅酶的循环^[67]。

与此同时, 山东理工大学的高秀珍团队也对 StDAPDH 进行了深入的研究。为了阐述底物特异性机制, 需要确认和机制相关的关键氨基酸位点, 因此该团队根据遗传进化关系和 DAPDH 家族的结构功能的比较, 推断 Arg71 可能与 StDAPDH 的底物特异性相关^[32]。通过对 Arg71 的定点突变及活性分析, 首次确认了 StDAPDH 和 DAPDH 家族中影响催化活力和底物特异性的非活性中心位点 Arg71; 分子模拟分析表明, 其主要机制是破坏了 Arg71 与 Tyr205 之间的阳离子 π 相互作用以及弱化 Thr70 与 NADPH 之间的氢键相互作用^[68]。首次确认的非活性中心关键氨基酸位点将为分析 StDAPDH 的底物特异性提供借鉴。然而通过分析不同来源 DAPDH 家族的氨基酸序列发现, 与底物相互作用的氨基酸位点在 I 类和 II 类 DAPDH 中是高度保守的, 与辅酶 NADP^+ 结合的位点也有 73.7%

高度保守; 其中 7 个保守但在两类 DAPDH 中氨基酸不同的位点(StDAPDH-II 类/CgDAPDH-I 类、Pro69/Gly67、Thr70/Ser68、Ser90/Thr88、Val156/Asp154、Val14/Leu14、Val68/Met66、Lys159/Arg157)被等位突变并分析, 使 StDAPDH 的催化机制被进一步洞悉^[69]。这些研究均为 StDAPDH 在未来从多个方向进行更具挑战性的 D-氨基酸合成提供了信息指导。

4 其他来源的 DAPDH

以上 3 个来源的 DAPDH 是目前发现的被用于合成 D-氨基酸的主要催化剂。除此之外, 也有少量其他来源的 DAPDH 被研究, 但均因效果不理想而没有进行后续深入的研究。例如, 为了制备 D-5,5,5-三氟戊氨酸(γ -分泌酶抑制剂的中间体), Hanson 等以来源于 *Bacillus sphaericus* 的 DAPDH (BsDAPDH)为模板, 按照 CgDAPDH/BC621 进行相同的突变改造, 以 5,5,5-三氟-2-氧戊酸为底物, 进行对应 D-氨基酸的合成; 在催化过程中, 为避免内源酶对产物选择性的影响, 敲除了宿主细胞的谷氨酸脱氢酶, 最终利用表达了 BsDAPDH 突变体的细胞工厂催化合成了 50 kg 规模的 D-5,5,5-三氟戊氨酸(产率 89%)^[70]。另外, 为了探索 DAPDH 催化底物谱的分子结合机制, 一个来源于 *Clostridium tetani* E88 的新型 DAPDH (CtDAPDH)被发掘; 由于此天然酶无法有效合成 D-氨基酸(符合 I 类 DAPDH 的催化特征), 因此将 CtDAPDH 按照 CgDAPDH/BC621 相同的位点和氨基酸进行改造。

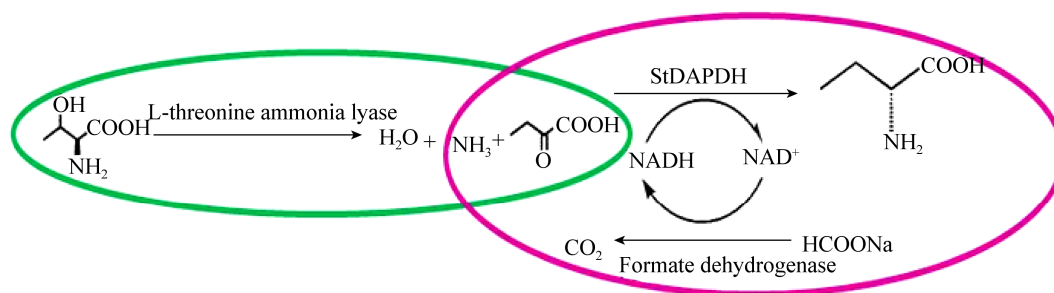


图 6 三酶级联催化 L-苏氨酸合成 D-2-氨基丁酸^[66]

Figure 6 Tri-enzymatic synthesis of D-2-aminobutyric acid from L-threonine^[66]

改造后的酶明显提高了对苯丙酮酸、丙酮酸、4-甲基-2-氧代戊酸的比活力^[71]。BsDAPDH 和 CtDAPDH 相关研究可以为其他 DAPDH 及 D-氨基酸的生物酶法合成提供一定的借鉴,但 BsDAPDH 和 CtDAPDH 相比较其他来源的 DAPDH (CgDAPDH、UtDAPDH、StDAPDH)并不具有优势。因此,新型 DAPDH 的挖掘依然是一个值得开发的方向,相信在未来的研究中会有更多具有优良催化性状的 DAPDH 被发现。

5 结论与展望

光学纯的非天然 D-氨基酸是非常重要的附加值手性化学品,被广泛应用于功能性食品、医药、农药、化妆品、调味品等领域。DAPDH 催化 α -酮酸发生还原胺化反应,立体选择性地不对称合成光学纯的手性 D-氨基酸具有原子经济性和绿色环保的优点。相信随着 D-氨基酸的应用价值被不断开发,有关 DAPDH 及其生物催化的研究会变得越来越重要。

本综述以不同来源的 DAPDH 为主干线,根据其发展史,系统地介绍了 DAPDH 开发为人造 D-氨基酸脱氢酶的相关研究进展。但有限的来源及研究成果依然无法满足工业生物催化领域的应用需求。目前依然存在 DAPDH 催化效率低、底物谱窄、底物难以获得、缺乏催化机制的指导信息等不足。因此,可以预期 DAPDH 未来的研究重点主要会集中在以下几个方面:(1) 新型 DAPDH 及其相似功能酶的挖掘及其催化性质和催化机理的研究;(2) 对现有 DADPH 的分子改造,实现对各种复杂构型 α -酮酸的还原胺化合成对应的 D-氨基酸;(3) 对现有 DAPDH 催化机理以及关键位点的探索,尤其是非活性中心以及蛋白质表面区域;(4) 对 DAPDH 催化功能转变的研究,例如,转变为同样是催化羰基还原胺化的氨脱氢酶,以及用于合成同样是非天然氨基酸的 D- β/γ -氨基酸;(5) 借助计算生物学手段从头设计 DAPDH,创造具有优良特性的人工酶;(6) 将 DAPDH 用于合成生物学途径设计出新的高效合成 D-氨基酸的生物催化路线。

REFERENCES

- [1] Gao XZ, Ma QY, Zhu HL. Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(8): 3341-3349
- [2] Akita H, Hayashi J, Sakuraba H, et al. Artificial thermostable D-amino acid dehydrogenase: creation and application[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1760
- [3] Genchi G. An overview on D-amino acids[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(9): 1521-1533
- [4] Han SW, Shin JS. One-pot preparation of D-amino acids through biocatalytic deracemization using alanine dehydrogenase and ω -transaminase[J]. *Catalysis Letters*, 2018, 148(12): 3678-3684
- [5] Walton CJW, Parmeggiani F, Barber JEB, et al. Engineered aminotransferase for the production of D-phenylalanine derivatives using biocatalytic cascades[J]. *ChemCatChem*, 2018, 10(2): 470-474
- [6] Liu Y, Zhu LF, Qi WP, et al. Biocatalytic production of D-*p*-hydroxyphenylglycine by optimizing protein expression and cell wall engineering in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(21/22): 8839-8851
- [7] Aranaz I, Heras NAA. Enzymatic D-*p*-hydrophenyl glycine synthesis using chitin and chitosan as supports for biocatalyst immobilization[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2018, 36(2): 89-101
- [8] Javid H, Wiyakrutta S. Increasing performance and thermostability of D-phenylglycine aminotransferase in miscible organic solvents[J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2018, 16(4): 264-272
- [9] Walton CJW, Thiebaut F, Brunzelle JS, et al. Structural determinants of the stereoinverting activity of *Pseudomonas stutzeri* D-phenylglycine aminotransferase[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(37): 5437-5446
- [10] Zhou Y, Wu SK, Li Z. One-pot enantioselective synthesis of D-phenylglycines from racemic mandelic acids, styrenes, or biobased L-phenylalanine via cascade biocatalysis[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2017, 359(24): 4305-4316
- [11] Kepert I, Fonseca J, Müller C, et al. D-tryptophan from probiotic bacteria influences the gut microbiome and allergic airway disease[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017, 139(5): 1525-1535
- [12] Liu YF, Xu GC, Han RZ, et al. Identification of D-carbamoylase for biocatalytic cascade synthesis of D-tryptophan featuring high enantioselectivity[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 720-728
- [13] Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners-a review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 51(4): 611-621
- [14] Bommarius AS, Schwarm M, Stingl K, et al. Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6(12): 2851-2888

- [15] Torizuka M, Suzuki H, Fujiwara K, et al. Emulsified, water-in-oil type composition and skin cosmetic preparation: US, 6440429[P]. 2002-08-27
- [16] Matsui D, Asano Y. Creation of thermostable L-tryptophan dehydrogenase by protein engineering and its application for L-tryptophan quantification[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 579: 57-63
- [17] Cheng J, Xu GC, Han RZ, et al. Efficient access to L-phenylglycine using a newly identified amino acid dehydrogenase from *Bacillus clausii*[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(84): 80557-80563
- [18] Au SK, Groover J, Feske BD, et al. Chapter 7-Organic synthesis with amino acid dehydrogenases, transaminases, amine oxidases, and amine dehydrogenases[A]//Goswami A, Stewart JD. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*[M]. New York: Academic Press, 2016: 187-212
- [19] Sharma M, Mangas-Sanchez J, Turner NJ, et al. NAD(P)H-dependent dehydrogenases for the asymmetric reductive amination of ketones: structure, mechanism, evolution and application[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2017, 359(12): 2011-2025
- [20] Chen X, Gao XZ, Zhu DM. Catalysis, engineering and application of amino acid dehydrogenases[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(8): 1249-1261 (in Chinese) 陈曦, 高秀珍, 朱敦明. 氨基酸脱氢酶的催化机理、分子改造及合成应用[J]. *微生物学报*, 2017, 57(8): 1249-1261
- [21] Xu JJ, Bai YJ, Fan TP, et al. Expression, purification, and characterization of a membrane-bound D-amino acid dehydrogenase from *Proteus mirabilis* JN458[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(10): 1559-1566
- [22] Hummel W, Gröger H. Reductive amination of keto acids[A]//Drauz K, Gröger H, May O. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*[M]. 3rd ed. New York: Wiley, 2012
- [23] Zhou HS, Meng LJ, Yin XJ, et al. 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
- [24] L'enfant M, Bruna F, Lorillière M, et al. One-pot cascade synthesis of (3S)-hydroxyketones catalyzed by transketolase via hydroxypyruvate generated *in situ* from D-serine by D-amino acid oxidase[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2019, 361(11): 2550-2558
- [25] Shimekake Y, Furuichi T, Abe K, et al. A novel thermostable D-amino acid oxidase of the thermophilic fungus *rasamsonia emersonii* strain YA[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 11948
- [26] Ball J, Gannavaram S, Gadda G. Structural determinants for substrate specificity of flavoenzymes oxidizing D-amino acids[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 660: 87-96
- [27] Abbott SD, Lane-Bell P, Sidhu KPS, et al. Synthesis and testing of heterocyclic analogs of diaminopimelic acid (DAP) as inhibitors of DAP dehydrogenase and DAP epimerase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(15): 6513-6520
- [28] Ma HG, Stone VN, Wang HQ, et al. Diaminopimelic acid (DAP) analogs bearing isoxazoline moiety as selective inhibitors against *meso*-diaminopimelate dehydrogenase (*m*-Ddh) from *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(16): 3840-3844
- [29] Sagong HY, Kim KJ. Structural basis for redox sensitivity in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate epimerase: an enzyme involved in L-lysine biosynthesis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 42318
- [30] Wang HQ, Kellogg GE, Xu P, et al. Exploring the binding mechanisms of diaminopimelic acid analogs to *meso*-diaminopimelate dehydrogenase by molecular modeling[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2018, 83: 100-111
- [31] Xu JZ, Ruan HZ, Liu LM, et al. Overexpression of thermostable *meso*-diaminopimelate dehydrogenase to redirect diaminopimelate pathway for increasing L-lysine production in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 2423
- [32] Gao XZ, Zhang Z, Zhang YN, et al. A newly determined member of the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase family with a broad substrate spectrum[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): e00476-17
- [33] Misono H, Togawa H, Yamamoto T, et al. Occurrence of *meso*- α,ϵ -diaminopimelate dehydrogenase in *Bacillus sphaericus*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1976, 72(1): 89-93
- [34] Scapin G, Reddy SG, Blanchard JS. Three-dimensional structure of *meso*-diaminopimelic acid dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(42): 13540-13551
- [35] Scapin G, Cirilli M, Reddy SG, et al. Substrate and inhibitor binding sites in *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(10): 3278-3285
- [36] Wang F, Scapin G, Blanchard JS, et al. Substrate binding and conformational changes of *Clostridium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase revealed by hydrogen/deuterium exchange and electrospray mass spectrometry[J]. *Protein Science*, 1998, 7(2): 293-299
- [37] Cirilli M, Scapin G, Sutherland A, et al. For the record: the three-dimensional structure of the ternary complex of *Corynebacterium glutamicum* diaminopimelate dehydrogenase-NADPH-L-2-amino-6-methylene-pimelate[J]. *Protein Science*, 2000, 9(10): 2034-2037
- [38] Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, et al. Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(33): 10923-10929
- [39] Ahmed ST, Parmeggiani F, Weise NJ, et al. Chemoenzymatic synthesis of optically pure L-and

- D-biarylalanines through biocatalytic asymmetric amination and palladium-catalyzed arylation[J]. *ACS Catalysis*, 2015, 5(9): 5410-5413
- [40] Parmeggiani F, Ahmed ST, Thompson MP, et al. Single-biocatalyst synthesis of enantiopure D-arylalanines exploiting an engineered D-amino acid dehydrogenase[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2016, 358(20): 3298-3306
- [41] Akita H, Fujino Y, Doi K, et al. Highly stable *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing[J]. *AMB Express*, 2011, 1(1): 43
- [42] Akita H, Doi K, Kawarabayashi Y, et al. Creation of a thermostable NADP⁺-dependent D-amino acid dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 *meso*-diaminopimelate dehydrogenase by site-directed mutagenesis[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(9): 1693-1699
- [43] Akita H, Suzuki H, Doi K, et al. Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(3): 1135-1143
- [44] Akita H, Imaizumi Y, Suzuki H, et al. Spectrophotometric assay of D-isoleucine using an artificially created D-amino acid dehydrogenase[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(11): 2245-2248
- [45] Akita H, Seto T, Ohshima T, et al. Structural insight into the thermostable NADP⁺-dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Ureibacillus thermosphaericus*[J]. *Acta Crystallographica Section D*, 2015, 71(5): 1136-1146
- [46] Hayashi J, Seto T, Akita H, et al. Structure-based engineering of an artificially generated NADP⁺-dependent D-amino acid dehydrogenase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): e00491-17
- [47] Qin YL, Ruan T, Hou HS, et al. A novel thermal stable carbonyl reductase from *Bacillus cereus* by gene mining as biocatalyst for β -carbonyl ester asymmetric reduction reaction[J]. *Catalysis Letters*, 2019, 149(2): 610-618
- [48] Luo W, Du HJ, Bonku EM, et al. An alkali-tolerant carbonyl reductase from *Bacillus subtilis* by gene mining: identification and application[J]. *Catalysis Letters*, 2019, 149(11): 2973-2983
- [49] Hannigan GD, Prihoda D, Palicka A, et al. A deep learning genome-mining strategy for biosynthetic gene cluster prediction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(18): e110
- [50] Gao XZ, Chen X, Liu WD, et al. A novel *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*: overexpression, characterization, and potential for D-amino acid synthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8595-8600
- [51] Gao XZ, Huang F, Feng JH, et al. Engineering the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* by site saturation mutagenesis for D-phenylalanine synthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(16): 5078-5081
- [52] Liu WD, Li Z, Huang CH, et al. Structural and mutational studies on the unusual substrate specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(2): 217-222.
- [53] Li HX, Gao SH, Qiu Y, et al. Genome mining integrating semi-rational protein engineering and nanoreactor design: roadmap for a robust biocatalyst for industrial resolution of Vince lactam[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 1109-1123
- [54] Naeem M, Rehman AU, Shen B, et al. Semi-rational engineering of carbonyl reductase YueD for efficient biosynthesis of halogenated alcohols with *in situ* cofactor regeneration[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 137: 62-70
- [55] Gao SH, Lu YX, Li YY, et al. Enhancement in the catalytic activity of *Sulfolobus solfataricus* P2 (+)- γ -lactamase by semi-rational design with the aid of a newly established high-throughput screening method[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 251-263
- [56] Zhang XD, Peng YQ, Zhao J, et al. Bacterial cytochrome P450-catalyzed regio- and stereoselective steroid hydroxylation enabled by directed evolution and rational design[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2020, 7(1): 2
- [57] Rahman Pour R, Ehibhathomhan A, Huang YL, et al. Protein engineering of *Pseudomonas fluorescens* peroxidase Dyp1B for oxidation of phenolic and polymeric lignin substrates[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 123: 21-29
- [58] Li TB, Zhao FJ, Liu ZC, et al. Structure-guided engineering of ChKRED20 from *Chryseobacterium* sp. CA49 for asymmetric reduction of aryl ketoesters[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 125: 29-36
- [59] de los Santos YL, Chew-Fajardo YL, Brault G, et al. Dissecting the evolvability landscape of the CalB active site toward aromatic substrates[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 15588
- [60] Cheng XK, Chen X, Feng JH, et al. Structure-guided engineering of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase for enantioselective reductive amination of sterically bulky 2-keto acids[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2018, 8(19): 4994-5002
- [61] Weckbecker A, Gröger H, Hummel W. Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds[A]//Wittmann C, Krull R. *Biosystems Engineering I: Creating Superior Biocatalysts*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010: 195-242
- [62] Zhao LM, Liu WD, Chen X, et al. Effect of residue Y76 on co-enzyme specificity of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(7): 1108-1118 (in Chinese)
- 赵雷明, 刘卫东, 陈曦, 等. 嗜热共生杆菌内消旋-2,6-二

- 氨基庚二酸脱氢酶中 Y76 对辅酶偏好性影响[J]. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1108-1118
- [63] Li YY, Pan HY, Chang YW, et al. Identification of key sites determining the cofactor specificity and improvement of catalytic activity of a steroid 5 β -reductase from *Capsella rubella*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 134: 109483
- [64] Li FL, Zhou Q, Wei W, et al. Switching the substrate specificity from NADH to NADPH by a single mutation of NADH oxidase from *Lactobacillus rhamnosus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 328-336
- [65] Li JJ, Chen X, Cui YF, et al. Enzymatic synthesis of D-alanine from a renewable starting material by co-immobilized dehydrogenases[J]. Process Biochemistry, 2018, 66: 126-132
- [66] Chen X, Cui YF, Cheng XK, et al. Highly atom economic synthesis of D-2-aminobutyric acid through an *in vitro* tri-enzymatic catalytic system[J]. ChemistryOpen, 2017, 6(4): 534-540
- [67] Zhang DP, Jing XR, Zhang WL, et al. Highly selective synthesis of D-amino acids from readily available L-amino acids by a one-pot biocatalytic stereoinversion cascade[J]. RSC Advances, 2019, 9(51): 29927-29935
- [68] Zhang YN, Ma QY, Dong MM, et al. Essential role of amino acid position 71 in substrate preference by *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum* IAM14863[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 111: 57-62
- [69] Gao XZ, Ma QY, Chen ML, et al. Insight into the highly conserved and differentiated cofactor-binding sites of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase StDAPDH[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2019, 59(5): 2331-2338
- [70] Hanson RL, Johnston RM, Goldberg SL, et al. Enzymatic preparation of an *R*-amino acid intermediate for a γ -secretase inhibitor[J]. Organic Process Research & Development, 2013, 17(4): 693-700
- [71] Liu WD, Guo RT, Chen X, et al. Structural analysis reveals the substrate-binding mechanism for the expanded substrate specificity of mutant *meso*-diaminopimelate dehydrogenase[J]. Chem Bio Chem, 2015, 16(6): 924-929