

# 天然产物分子结构的酶催化修饰改性

姜忠义\*

(天津大学化工学院 天津 30072)

**摘 要** 酶促反应作为高效、绿色和新颖的途径而在天然产物分子结构的修饰改性上得到了日益广泛的应用。本文简要评述了糖和糖苷、甾族化合物、抗生素、氨基酸和多肽类分子的酶催化结构修饰,预测了天然产物酶法结构修饰的发展趋势。

**关键词** 天然产物 酶 催化 结构修饰 组合酶催化

## Enzyme-catalyzed Structural Modification of Natural Product Molecules

JIANG Zhongyi

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

**Abstract** Enzymatic reaction, as a green and novel approach with high efficiency, has found more and more applications in natural products molecule modification. This paper briefly addressed the enzyme-catalyzed modification of natural products molecules including sugars and glycosides, steroids, antibiotics, amino acids and polypeptides, as well as some bioconjugates. The development tendency concerning the enzyme-catalyzed modification of natural products was tentatively predicted.

**Key words** Natural product molecules, Enzyme, Catalysis, Modification, Combinatorial biocatalysis

天然产物广泛存在于自然界中,并在生命活动中起着非常重要的作用。为了使生物有机分子得到更为有效和充分的利用,常需要对其结构进行适当的修饰。由于绝大多数天然产物的复杂分子结构中都含有多个官能团,从而给结构改造带来了极大的困难。结构修饰改性常用的方法有化学法、微生物法和酶法等三种方法。与化学法相比,酶法具有以下方面的优点<sup>[1~4]</sup>:操作条件温和、步骤简便、选择性高,有时能够完成一些化学法难以或无法进行的反应;同时,酶法也不像微生物法那样产物的分离纯化非常困难。在过去 10 年间,对各种常用酶的科学知识和应用水平已经得到大量积累,主要包括:酶作用机理的阐释、物理化学性质的改进、大规模生产方法的探索。酶法已经逐渐被合成有机化学家视为例行手段,过程工程师则将酶法视为经济上和生态上具有竞争力的技术。目前酶法修饰已经扩展到羟基化、环氧化、脱氢、加氢等氧化还原反应;水解、酯化、酰化、异构化和芳构化等其它多种类型的反应。

需要指出的是,由于天然产物种类繁多,能够用于结构修饰的酶的种类也是多种多样。所以这方面的研究多数尚处于探索状态。因此,本文仅就一些糖和糖苷、甾族化合物、抗生素、

---

姜忠义 男, 35 岁, 博士, 副教授, 主要从事酶和蛋白质工程研究。  
2001-07-12 收稿, 2001-12-06 修回

氨基酸和肽类酶法修饰的典型实例加以评述<sup>[5]</sup>, 并简单预测了上述天然产物酶法修饰改性的发展趋势。

## 1 糖和糖苷

糖和糖苷重要的生理功能和潜在的应用价值使其成为生物有机化学领域的热点。由于糖和糖苷分子上具有多个手性中心, 所含多个羟基具有非常接近的反应活性, 再加上碳水化合物在生物体内的功能研究不如蛋白质和脂肪那样广泛和深入, 从而使得这些糖类天然产物的改性仍然具有较大的盲目性和挑战性。

用于糖和糖苷结构修饰的常见酶包括各种糖基转移酶和糖苷水解酶、脂肪酶和蛋白酶以及醛缩酶等, 这些酶的共同特点是: 酶源丰富多样, 底物廉价易得。

### 1.1 糖基转移酶和糖苷水解酶

糖基转移酶和糖苷水解酶可用于选择性地把糖苷转化为有价值的二糖和低聚糖以及与其它羟基化化合物的偶联物。

天然糖和糖苷多由各种糖基转移酶使用糖核苷酸等底物合成, 该过程需要 ATP 水解来供能。各种糖基转移酶中, 目前工业化应用较多的主要是: 环糊精合成酶、 $\alpha$ -葡萄糖基转移酶、 $\beta$ -葡萄糖基转移酶、果糖基转移酶。

用于糖和糖苷改性的磷酸化酶主要有三类: 蔗糖磷酸化酶、麦芽糖磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶, 它们均属葡萄糖基转移酶<sup>[6]</sup>。以蔗糖磷酸化酶为例, 该酶能够催化两种类型的转移反应。一是将葡萄糖-1-磷酸 (G-1-P) 的 D-葡萄糖转移到受体化合物上; 另外一类反应是将蔗糖的 D-葡萄糖转移到受体分子上。

利用糖基转移酶改性糖和糖苷目前存在两个主要问题: 一是微生物糖基转移酶产量通常较低; 二是微生物糖基转移酶的稳定性较差。第一个问题的解决办法是: 将控制糖基转移酶蛋白合成的有关基因克隆到大肠杆菌中再扩大发酵培养, 从而大量地生产糖基转移酶。解决第二个问题的途径是采用合适的技术将酶进行固定化。

糖基转移酶选择性高, 能够作用的底物范围相对较窄。然而, 对于合适的底物, 该酶催化得到的改性糖和糖苷产品会具有很高的纯度。Palcic<sup>[7]</sup>、Wong<sup>[8]</sup>用糖基转移酶分别合成了三糖抗原和带有唾液酸片段的糖肽。大环内酯类抗生素和生物碱的糖基化作用、糖基配合作用以及 UDP 半乳糖克级合成的新颖实例也有文献报道<sup>[9,10]</sup>。

糖苷水解酶在合适的反应条件下, 也可以用来形成葡萄糖苷键。该法的缺点是在用于制备低聚糖时收率较低、立体选择性较差。为此, 科学家进行了大量的努力, 提出了两种比较有效的解决办法。第一种办法是酶源的适当筛选<sup>[11,12]</sup>。不同来源的糖苷水解酶在相同的反应条件下所呈现出的糖基转移酶活性/水解酶活性的比率彼此不同, 反应达到平衡时获得的改性糖类衍生物的产量也有很大差异。例如从 *Penicillium multicolor* 和 *Aspergillus niger*<sup>[13]</sup>中提取出的 $\alpha$ -半乳糖苷水解酶能够用来合成末端 $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Galp 或 $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Galp (Galp 代表吡喃半乳糖基), 而其它来源的 $\alpha$ -半乳糖苷水解酶则活性很低。

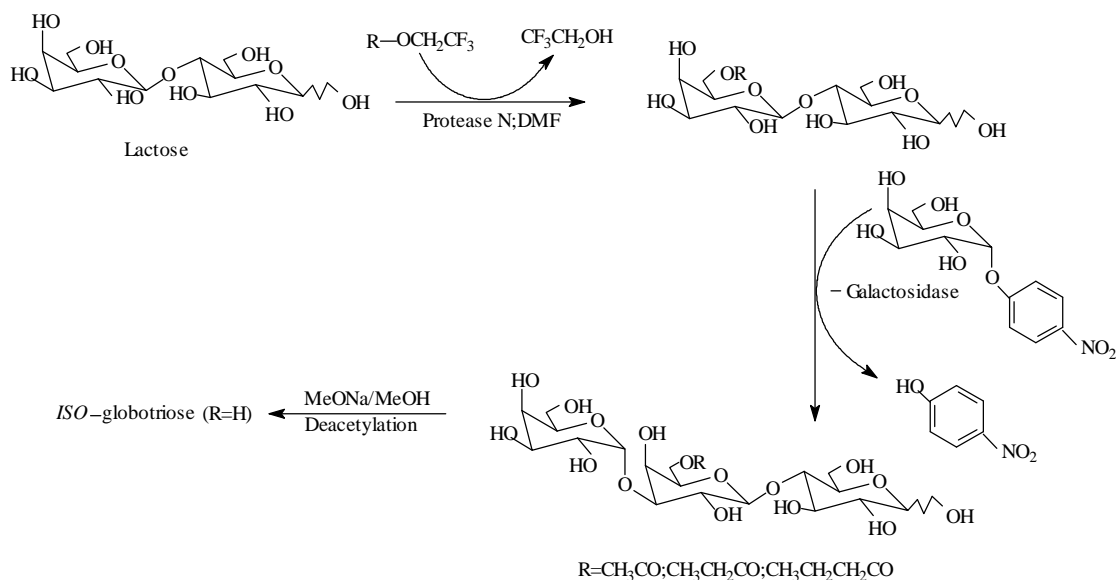


图 1 红细胞三糖的酶法合成

Fig. 1 Enzymatic synthesis of the trisaccharide *iso*-globotriose from lactose

第二种方法是将反应性更强的伯羟基通过脂肪酶或蛋白酶在有机相中催化酰化从而使糖基化作用能够在一个仲羟基上发生<sup>[14]</sup>。如图 1 所示。以乳糖为底物，通过两步酶促反应然后再脱酰基就可以制备出红细胞三糖。另外，糖苷水解酶可以用来在有机相-水两相介质中合成烷基葡糖苷，目前较为活跃的研究工作是反应介质的优化组合<sup>[15]</sup>。

利用糖苷水解酶改性糖和糖苷仍然存在的其它一些共性问题包括：糖苷水解酶的受体特异性，糖苷键合成的特异性，如何抑制糖苷水解酶的水解活性、提高产率，以及酶反应器设计等，有待于今后进一步深入研究。

### 1.2 醛缩酶 (aldolases)

醛缩酶被用来选择性地从简单的底物合成糖和糖的衍生物<sup>[16,17]</sup>。例如，酶法分析非常有用的一种底物，5-磷酸-D-木酮糖就可以以廉价易得的羟基丙酮酸和 1, 6-二磷酸果糖为原料通过多酶“一锅法”进行克级规模的合成。

### 1.3 脂肪酶和蛋白酶

脂肪酶<sup>[18]</sup>和蛋白酶(分别以脂类和蛋白质为天然底物)在糖和糖的衍生物区域选择性酰化和脱酰化中具有非常重要的应用。这些酶在非水介质中可以用来选择性地保护糖上的羟基<sup>[19]</sup>。

有关脂肪酶和蛋白酶的研究工作多集中在酶促反应条件的优化和酶应用领域的拓宽<sup>[20]</sup>，例如，用作神经节苷脂类似物的化学-酶联用法合成的载体，用来制备糖的酯类衍生物(例如类胡萝卜素、类胡萝卜素易被空气氧化，它们与抗坏血酸发生酯化反应后得到的酯类衍生物则具有很强的氧化稳定性)，用来合成生物可降解高分子的糖基单体<sup>[21]</sup>。

根据可能的反应机理，在设计天然糖苷的酶法酰化时人们通常选择在这些分子的含糖部分发生。一个重要的例子是脂肪酶催化的毛地黄皂甙，毛地黄皂甙是从 *Digitalis purpurea*<sup>[22]</sup>的籽中提取出来的。选择适宜的酰化剂，可使毛地黄皂甙中的戊糖部分中只有四个伯羟基中的一个和十一个仲羟基中的一个被来自 *Candida antarctica* 的脂肪酶催化进行酯化(见图 2)。黄酮糖苷

和核苷区域选择性酰化也有一些报道。例如：

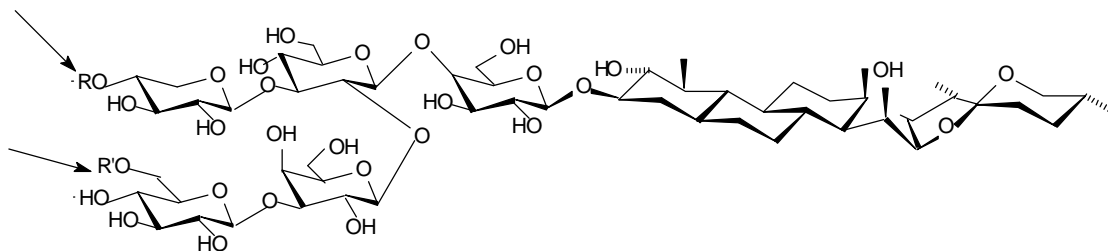


图 2 脂肪酶催化的毛地黄皂甙选择性酰化

Fig.2 Lipase-catalyzed selective acylation of diigntonin

Santaniello<sup>[23]</sup>报道了一个非常有趣的例子：肌苷和 2'-脱氧肌苷互补的区域选择性酰化，通过酶的恰当选择，可以只选择性地使仲羟基酰化而伯羟基则不发生反应。文章还举例介绍了通过化学-酶联用法制备糖基聚合物。

最后，在糖的酯化方面，Wong 等还用通过基因工程技术得到重组转移酶进行了糖（碳水化合物）和糖肽的选择性磺化<sup>[24]</sup>。

#### 1.4 氧化还原酶

用源于霉菌 *Trametes multicolor* 的吡喃糖 2-氧化酶催化 1→6 二糖（龙胆二糖、异麦芽糖和蜜二糖）的 C-2 氧化<sup>[25]</sup>。Dordick 介绍了一种合成糖类聚合物的化学-酶联用法，如图 3 所示，首先将半乳糖或半乳糖胺用半乳糖氧化酶氧化，然后再通过还原胺化过程进行聚合<sup>[26]</sup>。

### 2 氨基酸和多肽

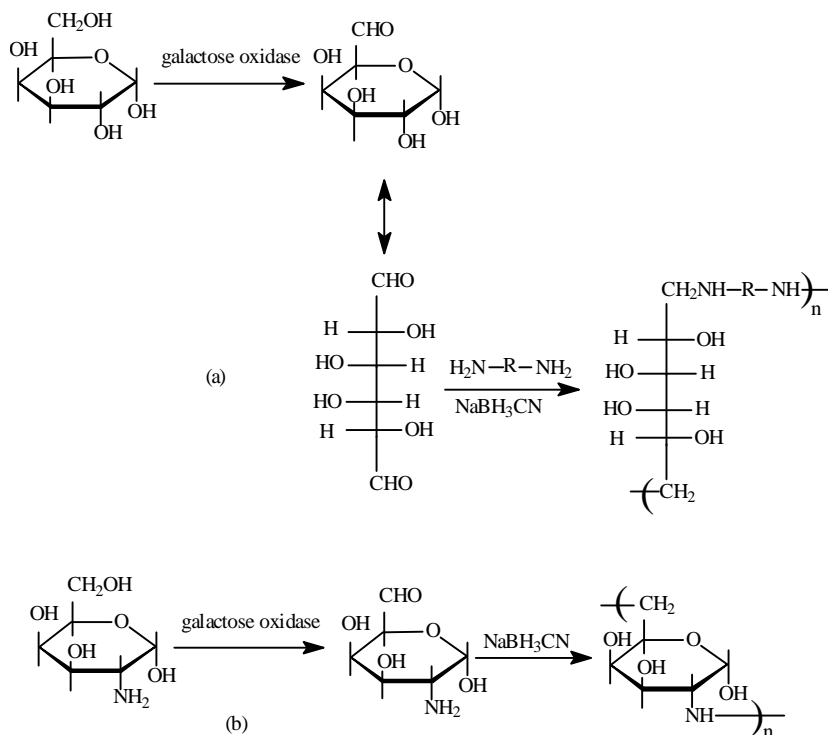


图 3 化学-酶联用法合成糖类聚合物

Fig.3 Chemo-enzymatic synthesis of sugar-based polymer

有关氨基酸和多肽的酶法修饰有大量的文献报道。例如, 水解酶用来催化天门冬氨酸二酯消旋混合物的动力学拆分<sup>[27]</sup>。而在酶法合成糖肽方面, Waldmann 等开展了不少领先水平的工作<sup>[28]</sup>, 通过对青霉素酰化酶敏感的 PhAcOZ 尿烷保护基团来合成活泼和多官能团的多肽-核苷(核肽)生物复合物证明是一条非常高效的途径<sup>[29,30]</sup>。

非天然氨基酸可以通过裂解酶和转移酶催化由天然氨基酸制备出来, 特别是苯丙氨酸氨基裂解酶用来合成几种氟基和氯基苯丙氨酸, 丝氨酸羟甲基转移酶能够催化甘氨酸和 4-戊醛之间的缩聚得到光学活性(旋光活性) L-苏氨酸。Sih<sup>[31]</sup>研究用氧化酶(辣根过氧化物酶、氯过氧化物酶)作用于含有酪氨酸的天然肽类来合成大环多肽。如图 4 所示, 通过辣根过氧化物酶两步催化可以得到万古霉素糖苷配基的二芳基片段, 只是目前收率偏低。

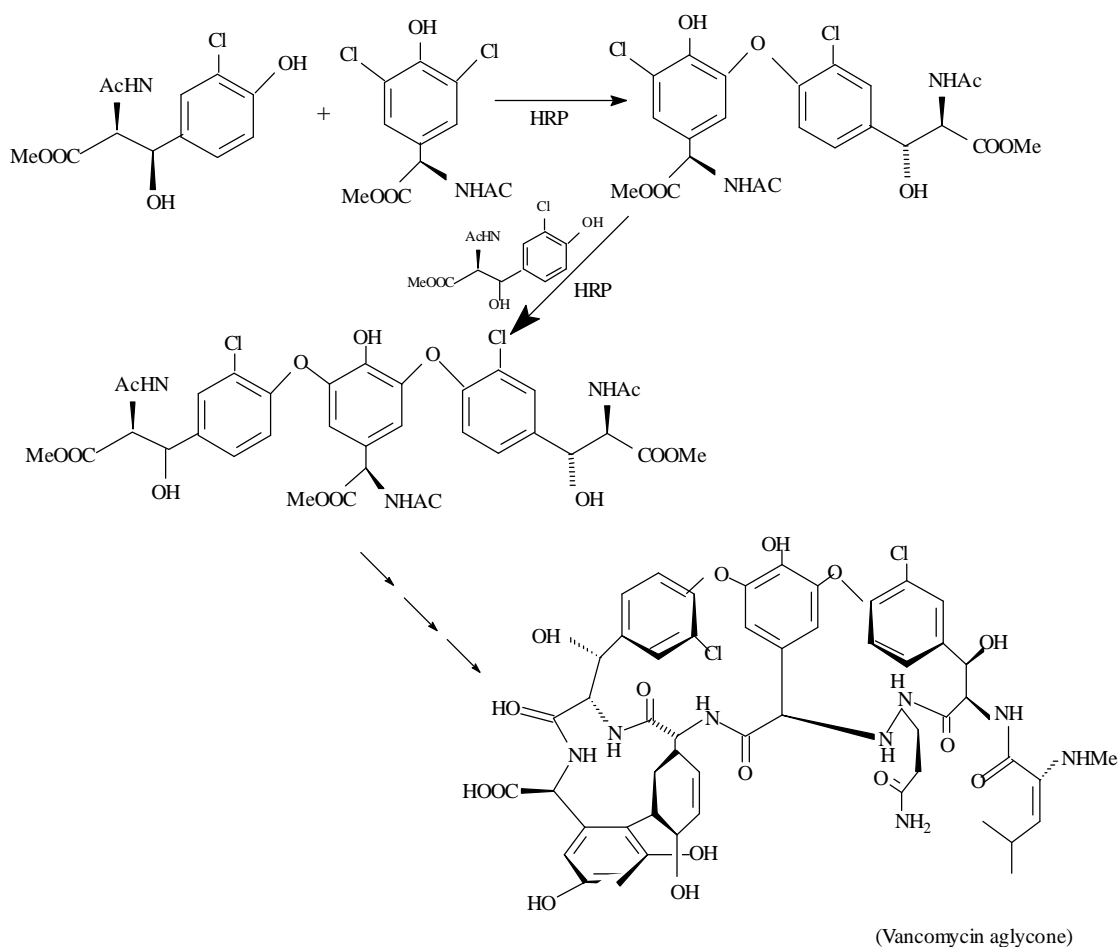


图 4 通过辣根过氧化物酶(HRP)两步催化得到万古霉素糖苷配基的二芳基片段

Fig.4 Synthesis of the bis-diaryl fragment of vancomycin aglycone catalyzed by horseradish peroxidase(HRP)

Sih 还开展了用 *Caldariomyces fumago* 中的氯过氧化物酶为催化剂进行万古霉素及其衍生物的氯化方面的研究工作。

由于多肽在生物信息学研究方面的重要作用以及其功能的多样性, 酶促反应或酶促反应与化学反应耦合对多肽进行修饰改性逐渐成为学术界研究的热点之一。脂肪酶由于具有良好的综

合性能在不少场合可以取代蛋白酶而发挥出高效的催化作用。

### 3 甾族化合物

甾族化合物的生物转化是生物催化史上的具有重要意义的工作。最近, 在不少论文中集中讨论了几种不同酶的催化活性, 如从不同微生物菌株得到的酶的羟基化活性比较<sup>[32]</sup>、从 *Pseudomonas paucimobilis*<sup>[33]</sup> 提取出的 3 $\alpha$ -羟基类固醇脱氢酶催化几种胆汁酸的氧化还原, 以及从 *Pseudomonas cepacia* 的脂肪酶催化甾族化合物侧链上的伯羟基的立体选择性酰化等<sup>[34]</sup>。

### 4 抗生素

目前, 用青霉素酰化酶制备半合成的-内酰胺抗生素仍然是研究和开发的热点<sup>[35]</sup>。

青霉素酰化酶催化的 6-氨基青霉素烷酸 (6-APA) 的合成属于抗生素酶法工业规模生产的成功范例。通过二酶催化从头孢霉素 C 制备 7-氨基头孢霉素酸 (7ACA) 也取得了良好的工业应用进展。但客观地讲, 目前研究者对合成中用到的一种新酶戊二酰基酰化酶的性质了解并不很多<sup>[36]</sup>。

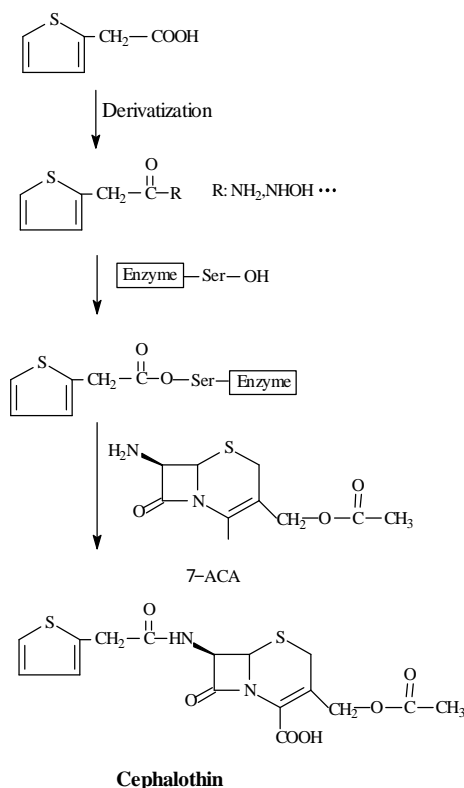


图 5 头孢噻吩的酶法合成

Fig.5 Enzymatic synthesis of cephalothin

头孢霉素的酶法合成也有大量的文献报道<sup>[37~39]</sup>, 具体可以分为热力学控制的方法和动力学控制的方法。在热力学控制的过程中, 酰基供体可以直接连接到酰基受体上, 但反应需要在高浓度的有机助溶剂中进行。由于有机溶剂可能会破坏酶的催化作用, 这给酶的选择带来了一定的困难。相比之下, 动力学控制的过程中, 反应在纯水相介质中进行, 可供使用的酶的种类多, 但酰基供体需要首先被活化。Shaw 等<sup>[40]</sup>尝试用青霉素 G 酰化酶来合成头孢噻吩 (图 5 所示),

为增加底物的水溶性以提高酶促反应的效率, 实验中采用酰胺类底物代替通常采用的水溶性较低的酯类底物。通过反应介质的有效调控来提高热力学控制的阿莫西林合成的平衡常数和收率的研究工作也取得了较大的进展<sup>[41]</sup>。

近年来, 分子生物学的迅速发展使新酶的获得比较容易, 酶的原性能也显著改进, 昂贵的辅助因子可以在线再生, 合成途径趋于多样化, 从而使得天然产物的大规模酶法修饰改性成为可能。加上“介质工程”的进步使酶促反应能够在更为适宜的条件下进行, 天然产物的酶法修饰改性在今后的一段时间会得到更快的发展。

### 参考文献

- [1] Fessner W D, Jones J B. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5:103~105.
- [2] Koeller K M, Wong C H. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18:835~841.
- [3] Ogawa J, Shimizu S. *TIBTECH*, 1999, 17:13~20.
- [4] Bailey J. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17:616~618.
- [5] Riva S. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5:106~111.
- [6] Cao J S, Wang X Q, Peng Z Y. *食品与发酵工业*, 1999, 25(4):41~47.
- [7] Seto N, Compston C A, Szpacenko A et al. *Carbohydrate Res.*, 2000, 324:161~169.
- [8] Koeller K M, Smith M E B, Huang R F et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 112:4241~4242.
- [9] Quiros L M, Carbajo R J, Brana A F et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275:11713~11720.
- [10] Jenkins G N, Stachulski A V, Scheinmann F et al. *Tetrahedron Asymmetry.*, 2000, 11:413~416.
- [11] Zeng X, Yoshino R, Murata T et al. *Carbohydr. Res.*, 2000, 325:120~131.
- [12] Murata T, Morimoto S, Zeng X et al. *Carbohydr. Res.*, 2000, 320:192~199.
- [13] Scigelova M, Crout D H G. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2000, 8:175~181.
- [14] Riva S, Roda G. *Methods in Non-aqueous Enzymology*. Ed. by Gupta M N. Basel: Birkäuser Verlag, 2000:146~159.
- [15] Huneke F U, Bailey D, Nucci R et al. *Biocatal. Biotrans.*, 2000, 18:291~299.
- [16] Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon R A. *Chem. Commun.*, 1999:2465~2466.
- [17] Guanti G, Banfi L, Zannetti M T. *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41:3181~3185.
- [18] Muralidhar R V, Marchant R, Nigam P. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2001, 76:3~8.
- [19] Carrea G, Riva S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2000, 39:2227~2254.
- [20] Cao L, Bornscheuer U T, Schmid R D. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 1999, 6:279~285.
- [21] Park O J, Kim D Y, Dordick J S. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 70:208~216.
- [22] Danieli B, Luisetti M, Steurer S et al. *J. Nat. Prod.*, 1999, 62:670~673.
- [23] Ciuffreda P, Casati S, Santaniello E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9:1577~1582.
- [24] Burkart M D, Izumi M, Chapman E et al. *J. Org. Chem.*, 2000, 65:5565~5574.
- [25] Volc J, Leitner C, Sedmera P et al. *J. Carbohydrate. Chem.*, 1999, 18:999~1007.
- [26] Liu X C, Dordick J S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121:466~467.
- [27] Liljeblad A, Kanerva L T. *Tetrahedron Asymmetry*, 1999, 10:4405~4415.
- [28] Sander J, Waldmann H. *Chem. Eur. J.*, 2000, 6:1564~1577.
- [29] Jeyaraj D A, Waldmann H. *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42:835~837.
- [30] Jungmann V, Waldmann H. *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39:1139~1142.
- [31] Malnar I, Sih C J. *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41:1907~1911.
- [32] Holland H L, Lakshmaiah G. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 1999, 6:83~88.
- [33] Bianchini E, Chinaglia N, Dean M et al. *Tetrahedron*, 1999, 55:1391~1398.
- [34] Ferraboschi P, Pecora F, Reza-Elahi S et al. *Tetrahedron Asymmetry*, 1999, 10:2497~2500.
- [35] Monti D, Carrea G, Riva S et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 70:239~244.
- [36] Van Langen L M, de Vroom E, van Rantwijk F et al. *FEBS Lett.*, 1999, 456:89~92.
- [37] Bruggink A, Roos E C, de Vroom E. *Org. Process Res. Dev.*, 1998, 2:128~133.
- [38] Fernandez-Lafuente R, Rosell C M, Piatkowska B et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, 19:462~469.
- [39] Maladkar N K. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16:715~718.
- [40] Shaw S Y, Shyu T C, Hsieh Y W et al. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26:142~151.
- [41] Diender M B, Straathof A J J, van der Wielen L A M et al. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 1998, 5:249~253.