

羰基还原酶辅酶结合域位点突变对其不对称催化性能的影响

官绪敏¹, 聂尧¹, 徐岩^{1,*}, 肖荣², Gaetano T. MONTELIONE²¹江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122²罗格斯大学高级生物技术与医学中心, 新泽西州 08854, 美国

摘要: 基于同源模型比较和分析, 发现羰基还原酶 SCR1 辅酶结合域 P124 和 W125 位点对辅酶 NADPH 的结合形成了一定的空间位阻效应. 通过对该位点进行小侧基氨基酸的取代突变, 该酶的底物专一性和立体选择性均发生了不同程度的改变, 表明该位点是酶与辅酶有效结合的关键位点, 而且它与辅酶结合的空间效应进一步影响了底物结合域活性中心对不同构型的底物及其对映体产物的亲和作用. 在底物专一性方面, 野生型酶对 2-羟基苯乙酮和 2-溴苯乙酮及其衍生物等底物表现出较高的催化活性, 而突变株 W125A, W125G, P124A/W125A 和 P124G/W125G 对苯乙酮及其部分衍生物和 2-辛酮等底物的催化活性均有所提高. 对于酶的立体选择性, 部分突变株发生了转化产物对映体构型反转的现象, 突变株 P124A/W125A 和 P124G/W125G 催化还原 2-羟基苯乙酮和 4-氯乙酰乙酸酯均生成了 (*R*)-型产物.

关键词: 羰基还原酶; 定点突变; 催化活性; 底物特异性; 立体选择性

中图分类号: O643 **文献标识码:** A

收稿日期: 2011-08-22. 接受日期: 2011-10-18.

*通讯联系人. 电话/传真: (0510)85918201; 电子信箱: yxu@jiangnan.edu.cn

基金来源: 国家自然科学基金 (30800017); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 2011CB710800, 2009CB724706); 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2011AA02A209, 2011AA02A210); 高等学校学科创新引智计划 (111 计划, 111-2-06); 江苏高校优势学科建设工程资助项目.

Influence of Site-Directed Mutagenesis in Coenzyme-Binding Domain of Carbonyl Reductase on Its Catalytic Performance for Asymmetric Reduction

GONG Xumin¹, NIE Yao¹, XU Yan^{1,*}, XIAO Rong², Gaetano T. MONTELIONE²¹School of Biotechnology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China²The Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Rutgers University, New Jersey 08854, USA

Abstract: Based on homology modeling analysis, the sites, P124 and W125, in cofactor-binding domain of the carbonyl reductase SCR1 were found to have a steric effect on the binding of NADPH. The site-directed mutagenesis of these two sites using the amino acid residues with small side group showed that the substrate specificity and stereoselectivity of the enzyme were both changed in some level, indicating that these sites have a critical role in binding the cofactor, and the configuration of catalytic active center formed from enzyme/cofactor complex determines the recognition of the enzyme to substrate of different type and also the product of different stereo-configuration. Regarding the substrate specificity, the wild-type enzyme showed activity toward 2-hydroxyacetophenone, 2-bromoacetophenone and its derivatives, while the catalytic efficiency of mutants toward acetophenone and its derivatives and 2-octanone was enhanced. On the other hand, the stereospecificity of some mutants was even found to be inverted. The mutants P124A/W125A and P124G/W125G exhibited a shift of enantioselectivity toward 2-hydroxyacetophenone and ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to give the product in (*R*)-configuration.

Key words: carbonyl reductase; site-directed mutagenesis; catalytic activity; substrate specificity; stereoselectivity

Received 22 August 2011. Accepted 18 October 2011.

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30800017), the National Basic Research Program of China (973 Program, 2011CB710800 and 2009CB724706), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2011AA02A209 and 2011AA02A210), the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111 Project, 111-2-06), and the

Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

目前生物催化剂在不对称合成中的应用广受关注;与化学合成相比,生物催化具有较高的立体选择性和位置选择性,可在常温、常压下进行反应(可避免因反应条件苛刻而引起的产物的异构,去消旋)等优势^[1,2]。其中,氧化-还原酶应用于有机合成时,可直接将潜手性化合物转化为手性醇,理论产率可达 100%,因此在工业生产中有很大的发展前景。

氧化-还原酶普遍存在于自然界中,已经报道的有细菌^[3]、酵母^[4]、植物^[5]和哺乳动物^[6]等。尽管大部分的氧化-还原酶已经应用于有机合成中^[7],但仍存在底物谱较窄、对映选择性不足等缺陷^[8]。因此,对酶进行分子改造已成为改善及拓展酶催化功能的一种有效手段^[9]。在改造方法和策略的选择上,对于催化羧基还原的氧化-还原酶而言,尚难以通过简单的基团反应建立适合高通量筛选的定向进化方案。因此,基于酶蛋白结构模型的理性设计已成为羧基还原酶分子改造的主要策略^[10]。理性设计是以对酶的空间结构与功能的认知为基础,对精确找到影响酶功能的位点具有重要的指导作用^[11,12]。*Thermoanaerobacter ethanolicus* 次级醇脱氢酶定点突变后得到突变体 C295A,对丁基酮和 α -支链酮的活性较野生型有所提高,从而改变了酶对底物的专一性^[13];红霉素聚合酶 (PKS) eryKR1 的多点突变 (F141W/P144G),使产物构型由 (R)-型变为 (S)-型,改变了酶的立体选择性^[14];定点突变也可以提高酶的催化活性,*Klebsiella pneumoniae* 甘油脱水酶 (GDHt) 经定点饱和突变后得到 38 株突变株 β -Q42L, β -Q42S 等,催化活性分别提高了 336 和 80 倍^[15]。因此,通过酶的不同结构域可发现与酶的催化活性、稳定性、底物特异性、对映选择性等密切相关的活性位点^[16]。这对于进一步认识酶的结构与其功能的关系具有重要意义。

目前,已报道的羧基还原酶大部分属于氧化-还原酶中的短链脱氢-还原酶 (SDR),其 GenBank 中注册的基因序列已超过 46000 种,PDB 数据库中已超过 300 个晶体结构^[17]。尽管 SDR 具有相似的结构特征^[18],如辅酶结合域的 Rossmann-fold 结构。辅酶结合序列 TGXXXGXG、保守的催化四联体 Asn-Ser-Tyr-Lys 等,但其序列同源性普遍较低(约为

15%~30%),酶蛋白的结构及催化功能也存在一定的多样性^[18,19]。

本课题组已从 *Candida parapsilosis* CCTCCM-203011 中发现了一种新型的羧基还原酶 SCR1。该酶依赖于辅酶 NADPH,对 β -取代的芳基酮(如 2-羟基苯乙酮)和 β -酮酯(如 4-氯乙酰乙酸乙酯 (COBE)) 有较高的催化活性,可以催化还原 2-羟基苯乙酮和 COBE 分别生成重要手性二元醇 (S)-苯基乙二醇和重要的药物中间体 (S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 (CHBE)^[20]。但是,SCR1 不能氧化糖类或醇,只能催化还原酮类底物^[21]。在蛋白结构上,通过构建 SCR1 的空间结构模型,将其与其他醇脱氢酶进行空间结构比较时发现,SCR1 辅酶结合域中间 W125 部分形成一段环形结构,并且该位点氨基酸残基的侧基对 NADPH 的结合形成一定的空间位阻效应(见图 1)。因此,本文尝试通过理性设计将 W125 与

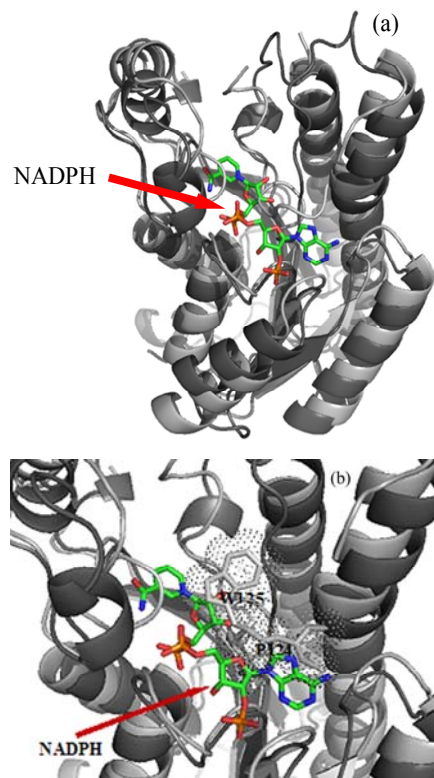


图 1 SCR1(灰色)与 *Lactobacillus brevis* 醇脱氢酶(黑色)(PDB: 1ZK4)空间结构比对及辅酶结合域结构与位点分析

Fig. 1. Structure alignment of SCR1 (gray) with alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* (black) (PDB: 1ZK4) (a) and the configuration of cofactor-binding domain and the relevant key sites (b).

相邻位点 P124 突变为侧基较小的氨基酸残基 A 或 G^[22,23]; 进而考察这些位点及其突变氨基酸对酶催化性能的影响。

1 实验部分

1.1 突变株的构建

根据基因上特定位点所需的突变设计不同的引物, 各突变株的引物设计如表 1 所列, 然后以实验室所构建的重组 SCR1 为模板^[20], 通过 QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 进行突变株的构建, 最后通过基因测序以确定为目标突变。具体的操作和 PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 20 s, 60 °C 10 s, 68 °C 3.5 min, 18 个循环; 68 °C 5 min。

1.2 突变株的活性表达和纯化

将目标突变株的质粒 DNA 导入表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 进行活性表达。

突变株活性表达的条件: 重组大肠杆菌在含氨苄青霉素 (生工生物工程有限公司) 的 LB 培养基中于 37 °C, 200 r/min 振荡培养, 至 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0 时, 加入 1 mmol/L 的 IPTG (生工生物工程有限公司), 于 17 °C, 200 r/min 振荡培养 12~18 h。

主要通过镍离子亲和层析柱 (GE Healthcare) 对突变株进行分离纯化。具体操作如下: 首先将菌体置于 15 ml Binding buffer (0.02 mol/L Tris-HCl, 0.04 mol/L 咪唑, pH = 7.5) 悬浮, 混匀, 用超声波破碎细胞 (破碎条件: 超声 1 s, 停 3 s, 总计 5 min)。破碎液在 12000 r/min, 4 °C 的条件下离心 30 min, 上清即为粗酶液; 然后用 His 镍柱对粗酶液进行分离纯化, 本实验所用 His 镍柱为手动装柱, 柱内填料为 1 ml, 纯化组分依靠重力作用通过镍柱。首先用 Binding

buffer 平衡亲和柱, 再将经过 0.45 μm 水膜过滤后的粗酶液加入到柱内, 用浓度分别为 40, 60, 80 和 100 mmol/L 的咪唑溶液梯度洗脱去除杂蛋白, 最后用 300 mmol/L 的咪唑溶液洗脱目的蛋白, 并收集活性组分; 用 Econo-Pac 10DG columns (美国 Bio-Rad) 对目标蛋白溶液进行脱盐, 约得到 4 ml 的目标蛋白溶液; 最后用 Amicon Ultra-4 超滤装置对脱盐后的蛋白溶液进行浓缩, 即得到突变酶纯酶液。

1.3 突变酶比活的测定

辅酶 NADPH 在 λ = 340 nm 处有特征吸收峰, 通过测定反应过程中 λ = 340 nm 处吸光度的变化来衡量氧化-还原酶的活力。

检测突变株对模式底物^[20]的催化活性时, 总反应体系为 100 μl, 其中 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH = 6.5) 30 μl, 0.6 mmol/L 辅酶 NADPH (北京经科宏达有限公司) 10 μl, 5 mmol/L 底物 (2-羟基苯乙酮购于 TCI, COBE 购于 Sigma-Aldrich) 10 μl 及 50 μl 纯酶^[20]。用酶标仪 (Thermo Scientific Multiskan Spectrum) 同时扫描各酶在 λ = 340 nm 处吸光度的变化。

考察突变酶的底物特异性时, 总反应体系体积为 100 μl。其中 1 mmol/L 的辅酶 NADPH 10 μl, 6 mmol/L 的底物 (衍生类底物为实验室制备, 其他底物均购于 Sigma-Aldrich) 60 μl, 粗酶液 30 μl。底物和粗酶液的溶剂均为 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH = 6.5)。

将在上述条件下每分钟催化氧化 1 nmol NADPH 的酶量定义为 1 个酶活单位。

酶活的计算公式为: 酶活 (nmol/min) = $EW \times V \times 10^6 / (6220 \times 0.15)$

比活 = 酶活 (nmol/min) / m_E (mg)

表 1 定点突变设计的引物

Table 1 Primers designed for mutagenesis

W125A	W125A-F: CCAACGCTGGTATTCCAGCGACGGATGGACCAGAAATTG W125A-R: CAATTTCTGGTCCATCCGCGCTGGAATACCAGCGT TGG
W125G	W125G-F: CCAACGCTGGTATTCCAGGGACGGATGGACCAGAAATTG W125G-R: CAATTTCTGGTCCATCCGTCCCTGGAATACCAGCGTTGG
P124A/W125A	P124A/W125A-F: GCCAACGCTGGTATTGCAGCGACGGATGGACCAGAAATTG P124A/W125A-R: CAATTTCTGGTCCATCCGTCCGCTGCAATACCAGCGTTGGC
P124G/W125G	P124G/W125G-F: GCCAACGCTGGTATTGGAGGGACGGATGGACCAGAAATTG P124G/W125G-R: CAATTTCTGGTCCATCCGTCCCTCCAATACCAGCGTTGGC

The primers were designed according to QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit.

式中, EW 为 1 min 内 340 nm 处吸光度的变化, V 为反应液的体积 (ml), 6220 为摩尔消光系数 ($L/(mol \cdot cm)$), 0.15 为光程距离 (cm), m_E 为反应体系中酶的蛋白含量 (mg).

取 2 μ l 纯化后的酶, 用 Thermo Scientific Nanodrop 8000 型分光光度计检测 $\lambda = 280$ nm 处吸光值, 并根据摩尔消光系数换算得到目标蛋白浓度.

1.4 突变株的全细胞催化转化反应

在 2 ml 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH = 6.5) 中加入 1 mmol/L 底物 (2-羟基苯乙酮或 COBE), 0.2 g 湿菌体, 20 mg 葡萄糖, 150 r/min, 30 $^{\circ}$ C 反应 48 h. 反应结束后, 加入 2 倍体积乙酸乙酯或正己烷萃取, 有机相用高效液相色谱仪和气相色谱仪分析产物收率及光学纯度^[24]. 色谱柱为 Chiralcel OB-H 柱 (4.6 mm \times 25 cm; 日本 Daicel Chemical 公司), 流动相为正己烷/异丙醇 (9:1), 流速 0.4 ml/min. 根据峰面积计算产物的 ee 值.

2 结果与讨论

2.1 突变酶的活性表达与纯化

经定点突变改造后的酶蛋白表达较好, 与初始野生型酶蛋白在重组大肠杆菌系统中的表达量相似. 图 2 (a) 为重组 *E. coli* BL21(DE3) 粗酶液的 SDS-PAGE. 可以看出, 突变株与突变前 SCR1 表达的蛋白质分子量大小相同 (约 35 kDa). 图 2 (b) 为纯化后酶液的 SDS-PAGE. 可以看出, 经过镍柱亲和层析后, 酶液已达到电泳纯.

2.2 定点突变对催化活性的影响

以野生型酶 SCR1 的初始底物 2-羟基苯乙酮和 COBE 作为底物时, 在 P124 和 W125 位点进行小侧基氨基酸残基 (A 或 G) 取代后的突变酶与对照 SCR1 的酶活比较, 结果见表 2. 经定点突变后, 酶对于上述两种底物的活性发生了较大的变化, 说明突变以后辅酶结合域的空间构象发生改变, 而辅酶

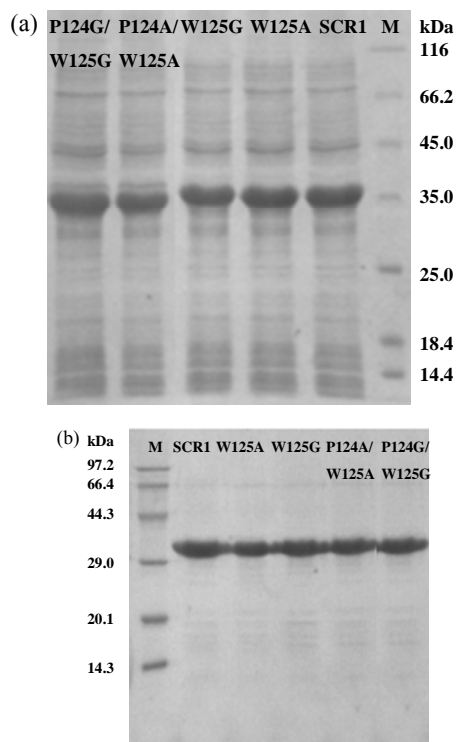


图 2 SDS-PAGE 检测工程酶的表达与纯化

Fig. 2. The SDS-PAGE analysis of the crude extract and purified enzyme of engineered enzymes. (a) Crude extract of enzymes; (b) The purified enzyme M (Protein molecular weight marker). The proteins were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250.

的吡啶环又参与了酶催化还原反应中的电子传递, 因此辅酶的结合状态影响了酶催化活性中心对底物的识别关系, 进而影响了酶对特定底物的催化活性.

2.3 定点突变对酶的底物特异性的影响

因突变株对模式底物 COBE 和 2-羟基苯乙酮的催化活性有重要影响, 需要了解突变株是否同时改变了酶的底物特异性, 所以考察了酶对脂肪酮、芳香基酮和 β -酮酯类等底物的活性, 结果见表 3. 由表可见, SCR1 催化的底物主要有 R_1 位-OH 或-Br 取代的芳香酮衍生物及酮酯类的 COBE 等, 相对于 SCR1, 突变株对苯乙酮和苯乙酮的 p -CH₃、 p -OCH₃

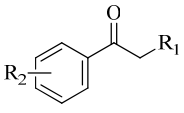
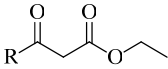
表 2 纯酶 SCR1 及突变株的比活

Table 2 Specific activity of purified SCR1 and mutants

Substrate	Specific activity (nmol/(min·mg))				
	SCR1	W125A	W125G	P124A/W125A	P124G/W125G
2-Hydroxyacetophenone	22.0 \pm 5.0	3.4 \pm 0.6	4.0 \pm 0.4	2.8 \pm 0.2	9.4 \pm 2.7
COBE	73.0 \pm 6.0	5.2 \pm 0.4	13.6 \pm 0.2	10.0 \pm 1.3	29.6 \pm 0.2

Reaction conditions: total volume 100 μ l, 0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH = 6.5), NADPH 0.6 mmol/L, substrate 5 mmol/L, suitable volume enzyme.

表 3 SCR1 和 W125A/G 纯酶对不同底物的比活
Table 3 The specific activity toward different substrates of purified SCR1 and mutants

Substrate		Specific activity (nmol/(min·mg))					
		SCR1	W125A	W125G	P124A/W125A	P124G/W125G	
Acetophenone and its derivative 	R ₁ =H	R ₂ = <i>o</i> -Cl	6.0 ± 0.5	4.9 ± 0.5	5.0 ± 0.2	4.0 ± 0.4	6.4 ± 0.1
		R ₂ = <i>m</i> -Cl	4.0 ± 0.2	5.7 ± 0.1	6.5 ± 0.9	11.0 ± 1.2	6.3 ± 0.3
		R ₂ = <i>p</i> -Cl	5.8 ± 0.2	0	5.7 ± 0.5	9.2 ± 0.1	6.4 ± 0.4
		R ₂ = <i>p</i> -Br	20.4 ± 4.3	4.7 ± 0.6	0	5.3 ± 0.2	4.2 ± 0.2
		R ₂ = <i>p</i> -CH ₃	0	7.0 ± 0.1	5.2 ± 0.4	6.8 ± 0.5	7.0 ± 0.1
	R ₁ =OH	R ₂ = <i>p</i> -OCH ₃	2.2 ± 0.5	6.8 ± 1.3	5.5 ± 0.6	3.0 ± 0.2	5.0 ± 0.1
		R ₂ =H	3.4 ± 0.6	7.0 ± 0.1	7.7 ± 0.2	5.0 ± 0.3	6.0 ± 0.5
		R ₂ = <i>m</i> -Cl	94.0 ± 4.0	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0	0
		R ₂ =H	54.0 ± 2.0	4.8 ± 0.1	6.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1	5.1 ± 0.2
		R ₂ = <i>p</i> -CH ₃	154.0 ± 4.5	3.2 ± 0.8	0	5.1 ± 0.3	7.4 ± 0.6
R ₁ =Br	R ₂ = <i>p</i> -Cl	90.0 ± 3.0	5.5 ± 0.6	5.3 ± 0.5	0	8.7 ± 0.5	
	R ₂ = <i>p</i> -OCH ₃	106.0 ± 3.2	0	7.0 ± 0.8	0	6.8 ± 0.2	
Valerophenone		5.6 ± 1.3	4.3 ± 0.6	5.4 ± 0.8	8.6 ± 0.1	4.5 ± 0.2	
Keto ester 	R=Phenyl	5.6 ± 1.4	5.0 ± 0.8	7.5 ± 0.3	6.7 ± 0.4	6.5 ± 0.3	
	R=CF ₃	14.0 ± 0.5	5.1 ± 0.1	8.1 ± 0.5	5.7 ± 0.2	7.8 ± 0.2	
	R=CH ₂ Cl	114.0 ± 4.8	7.9 ± 1.6	8.1 ± 0.4	12.2 ± 0.1	12.1 ± 1.0	
Aliphatic ketone	R=2-octanone	2.6 ± 0.6	5.0 ± 0.3	9.0 ± 0.8	9.3 ± 0.4	6.7 ± 0.2	

Reaction conditions: total volume 100 μ L, 0.1 mol/L Potassium phosphate buffer (pH = 6.5), NADPH 1 mmol/L, substrate 6 mmol/L, suitable volume enzyme.

衍生物及 2-辛酮的催化活性均有所提高。其中, P124A/W125A 对苯戊酮的酶活最高。

结合不同类型底物的官能团化学结构可知, 该酶突变株对于羰基相邻位置不含亲电子基团的底物活性有所提高, 如苯乙酮及其衍生物、脂肪酮类的 2-辛酮等。此外, 通过比较相同的酶对不同底物的活性, 可以发现酶对 COBE 的催化活性普遍较高。上述结果表明, P124, W125 位点对酶识别底物特异性有一定的影响。虽然这两个位点处于酶蛋白的

辅酶结合域, 但会影响辅酶在酶蛋白结构域中的位置和状态, 进而影响由辅酶参与形成的酶底物结合域和活性中心的空间构型。酶对不同结构底物化合物的结合作用, 如图 3 所示。

2.4 定点突变对立体选择性的影响

酶的底物结合域及催化活性中心的空间构象会影响其对底物结构的识别和定位, 进而影响其活性中心辅酶吡啶环上 C4 位的电子对潜手性羰基的进攻方向, 导致生成不同对映体构型的产物。本文分

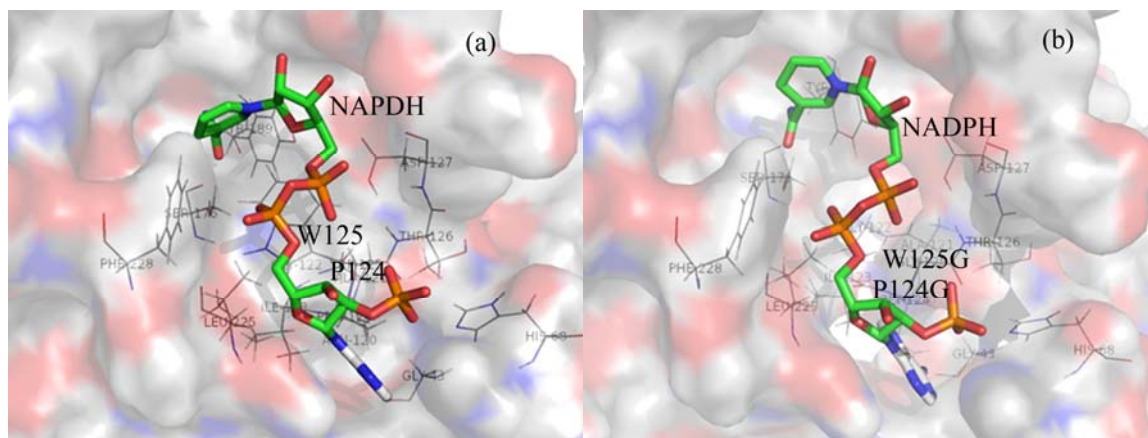


图 3 野生型酶与突变酶 P124GW125G 的辅酶结合域及活性中心空间构象的比较

Fig. 3. Structure and configuration comparison of cofactor-binding domain and active sites between wide type SCR1 (a) and its mutant P124GW125G (b).

别以 2-羟基苯乙酮和 COBE 为潜手性羰基化合物底物, 考察辅酶结合域中 P124, W125 位点突变对于酶催化立体选择性的影响, 结果列于表 4。可以看出, 以 2-羟基苯乙酮为底物时, W125 位的单点突变导致酶对该底物的 (*S*)-专一性显著下降。而对 P124 和 W125 两个位点同时进行突变时, 酶催化转化两种底物的选择性则发生了反转, 即 2-羟基苯乙酮和 COBE 的还原产物构型均由野生型酶的 (*S*)-专一性转变为 (*R*)-专一性。这表明辅酶结合域中这两个位点突变不仅使酶的催化选择性发生明显改变, 而且 P124 位点的突变更有利于改变酶的立体选择性。

表 4 全细胞催化转化还原 2-羟基苯乙酮和 COBE

Table 4 Reduction of 2-hydroxyacetophenone and COBE by whole cell

Strain	ee/%	
	2-hydroxyacetophenone	COBE
BL21	0	0
SCR1	97.2 ± 0.2 (<i>S</i>)	90.0 ± 1.0 (<i>S</i>)
W125A	69.4 ± 5.0 (<i>S</i>)	0
W125G	7.0 ± 1.0 (<i>S</i>)	0
P124A/W125A	23.3 ± 1.6 (<i>R</i>)	90.0 ± 2.0 (<i>R</i>)
W125G/P124G	90.0 ± 2.0 (<i>R</i>)	90.0 ± 1.0 (<i>R</i>)

Reaction conditions: total volume 2 ml, 0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH = 6.5), substrate 1 mmol/L, 0.2 g wet whole cells, 20 mg glucose, 30 °C, 150 r/min, reaction time 48 h.

3 结论

羰基还原酶 SCR1 的辅酶结合域 W125、P124 位点对酶的催化活性、底物特异性及立体选择性有所影响。这两个位点形成的空间位阻效应对于该酶与辅酶 NADPH 的结合产生一定的影响, 是参与辅酶 NADPH 结合的重要作用位点。通过将该位点突变为侧基较小的氨基酸残基, 引起的酶结合辅酶的状态变化, 进而影响酶的底物结合域及催化活性中心的空间构象, 从而在一定程度上改变了酶的底物特异性和立体选择性。对于需要辅酶参与的羰基还原酶催化的不对称还原反应, 其辅酶结合域的结构变化会对最终酶的活性及性能表征产生影响。因此, 这对探究影响酶的底物选择性和立体选择性的活性氨基酸位点的结构与功能, 具有一定的指导意义。

参 考 文 献

1 Patel R N. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**: 804

- Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 237
- Schroer K, Mackfeld U, Tan I A W, Wandrey C, Heuser F, Bringer-Meyer S, Weckbecker A, Hummel W, Daußmann T, Pfaller R, Liese A, Lutz S. *J Biotechnol*, 2007, **132**: 438
- Ema T, Yagasaki H, Okita N, Nishikawa K, Korenaga T, Sakai T. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**: 1075
- Xie Y, Xu J H, Lu W Y, Lin G Q. *Bioresour Technol*, 2009, **100**: 2463
- Bougioukou D J, Stewart J D. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**: 7655
- Gamenara D, de María P D. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**: 278
- Inoue K, Makino Y, Itoh N. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**: 2539
- Strohmeier G A, Pichler H, May O, Gruber-Khadjawi M. *Chem Rev*, 2011, **111**: 441
- 朱敦明. 见: 中国化学会第 27 届学术年会第 06 分会场摘要集. 厦门: 厦门大学出版社 (Zhu D M. In: The 06 Venue Summary of the 27th Chinese Chemical Society Annual Meeting. Xiamen: Xiamen Univ Press), 2010. 06-O-002
- Burton S G, Cowan D A, Woodley J M. *Nature Biotechnol*, 2002, **20**: 37
- 朱敦明, 吴洽庆. 生物工程学报 (Zhu D M, Wu Q Q. *Chin J Biotech*), 2009, **25**: 1770
- Heiss C, Laivenieks M, Zeikus J G, Phillips R S. *Bioorg Med Chem*, 2001, **9**: 1659
- Baerga-Ortiz A, Popovic B, Siskos A P, O'Hare H M, Spiteller D, Williams M G, Campillo N, Spencer J B, Leadlay P F. *Chem Biol*, 2006, **13**: 277
- Qi X H, Chen Y L, Jiang K, Zuo W P, Luo Z F, Wei Y T, Du L Q, Wei H, Huang R B, Du Q S. *J Biotechnol*, 2009, **144**: 43
- Stewart J D. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, **5**: 120
- Persson B, Kallberg Y, Bray J E, Bruford E, Dellaporta S L, Favia A D, Duarte R G, Jörnvall H, Kavanagh K L, Kedishvili N, Kisiela M, Maser E, Mindnich R, Orchard S, Penning T M, Thornton J M, Adamski J, Oppermann U. *Chem Biol Interact*, 2009, **178**: 94
- Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X Q, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jörnvall H. *Chem Biol Interact*, 2003, **143**: 247
- Kavanagh K L, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. *Cell Mol Life Sci*, **65**: 3895
- Nie Y, Xiao R, Xu Y, Montelione G T. *Org Biomol Chem*, 2011, **9**: 4070
- Yan Z, Nie Y, Xu Y, Liu X, Xiao R. *Tetrahedron Lett*, 2011, **52**: 999
- Reetz M T, Bocola M, Carballeira J D, Zha D X, Vogel A. *Angew Chem, Int Ed*, 2005, **44**: 4192
- Carrigan J B, Engel P C. *FEBS J*, 2007, **274**: 5167
- 闫真. [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学 (Yan Zh. [MS Dissertation]. Wuxi: Jiangnan Univ), 2010