

· 特邀综述 ·



魏东芝 二级教授, 华东理工大学鲁华生物技术研究所所长。学术兼职: 生物化工国家重点学科带头人, 教育部生物技术与生物工程专业教指委副主任委员, 中国微生物学会酶工程专业委员会副主任, 上海生物工程学会副理事长。荣誉称号: 全国优秀科技工作者, 教育部跨世纪优秀人才, 教育部新世纪优秀人才, 中国科学院“百人计划”入选者, 上海市领军人才, 上海市优秀学科带头人, 上海市科技英才提名, 上海市科技启明星, 山东省“泰山学者”, 山东省“泰山产业领军人才”。从事酶学与生物催化研究 30 多年, 在 *Angewandte Chemie*、*Metabolic Engineering*、*Biomaterials*、*Green Chemistry*、*Applied and Environmental Microbiology*、*Chemical Communications*、*Biotechnology and Bioengineering* 等期刊发表 300 余篇论文, 他引超过 6 500 次, 获授权中国发明专利 45 项, 实审国际专利 3 项, 工业酶制剂生产、生物催化与转化实现手性非天然氨基酸、甾体药物中间体及多元醇衍生物等项目在 12 家企业实现产业化 (受益企业 50 多家)。曾获国家技术发明二等奖 1 项, 上海市技术发明及科技进步一等奖 3 项, 第十五届国际工业博览会铜奖 1 项, 杜邦-杰能科中国酶工程杰出贡献奖。

定制酶分子机器/细胞工厂, 引领生物制造产业未来

——2017 年第十一届中国酶工程学术研讨会杜邦-杰能科中国酶工程杰出贡献奖获得者特邀报告

姜水琴, 魏东芝

华东理工大学 生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室 鲁华生物技术研究所, 上海 200237

姜水琴, 魏东芝. 定制酶分子机器/细胞工厂, 引领生物制造产业未来. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1024–1032.

Jiang SQ, Wei DZ. Customization of enzyme molecular machine and cell factory, leading the future of biomanufacturing industry. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1024–1032.

摘要: 工业酶制剂研发与应用已经渗透到各大工业领域, 但中国作为用酶大国、产酶小国面临重大挑战, 鉴于以化学催化为核心的基础物质加工业面临资源、能源和环境三大危机, 酶工程与生物催化已被列入许多国家的科技与产业发展战略, 应用高效、清洁的生物催化技术是实现化学工业可持续发展以及发酵工业产业升级的重要途径之一。文中以 2017 年第十一届中国酶工程学术研讨会杜邦-杰能科中国酶工程杰出贡献奖获得者特邀报告为基础整理编写而成, 从自主酶库构建、酶分子机器/细胞工厂创制及产业化应用等角度概述当前酶工程与生物催化发展现状及前景。

Received: April 25, 2018; **Accepted:** June 5, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21676090), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2017M621390), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 222201814037).

Corresponding author: Dongzhi Wei. E-mail: dzhwei@ecust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21676090), 中国博士后科学基金 (No. 2017M621390), 中央高校基本科研业务费 (No. 222201814037) 资助。

关键词: 酶分子机器, 细胞工厂, 生物制造, 产业未来, 催化剂定制

Customization of enzyme molecular machine and cell factory, leading the future of biomanufacturing industry

Shuiqin Jiang, and Dongzhi Wei

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Newworld Institute of Biotechnology, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: The development and application of industrial enzymes have penetrated major industrial fields. China faces a major challenge as a large country in applying enzyme but a small one in producing enzyme. Biocatalysis has become an important technology and strategy of industrial development in the world since chemical catalysis encounters the crises from resource, energy and environment. The application of efficient and clean biocatalysis is one of the important ways to realize the sustainable development of chemical industry and to modernize the fermentation industry. From perspective of the industry-university-research cooperation, we reviewed the current status and the future development of enzyme engineering from the aspects of enzyme resources, customization of enzyme molecular machine and cell factory.

Keywords: enzyme molecular machine, cell factory, biomanufacturing, industry development, catalysts customization

传统工业体系依赖化石资源, 但化石资源储存有限且不可再生, 同时化石资源的工业化应用引起了全球气候变暖、大气污染、海洋污染等严重的环境问题。传统工业体系面临严重的环境危机、资源危机以及能源危机, 如何减少或摆脱对化石资源的依赖、建立可持续的社会经济发展模式引起全球关注和思考。工业生物技术清洁、可再生, 被称为白色生物技术, 其能源和工业原料等不再完全依赖于化石能源, 并有助于解决温室气体排放等环境问题。工业生物技术的核心是酶与生物催化, 因此, 发展工业酶及生物催化与转化技术, 创建绿色生物制造工业体系已经成为社会经济可持续发展的重大战略方向。酶工程作为生物制造工业体系的核心受到学术界和工业界的密切关注, 近年来高通量测序和定向进化技术、计算生物学以及结构生物学的进步推动了酶工程领域的迅速发展。文中以 2017 年第十一届中国酶工程学术研讨会“杜邦杰能科中国酶工程杰出贡献奖”获得者特邀报告为蓝本, 从自主酶库构建、酶分子机器/细胞工厂创制及产业应用等方面概述了

当前酶工程与生物催化领域的发展现状及前景。

1 自主酶库的构建

现代经济社会的发展更加注重绿色可持续发展, 酶作为催化剂因环境友好等特点长期受到化学合成领域的关注^[1-4]。为满足化学合成对酶催化剂的需求, 针对中国“用酶大国、产酶小国”的现实, 作者团队坚持“自主酶库、自主应用”原则, 开展了系统性的酶库构建工作。自然界大量的微生物酶基因难以培养捕获, 作者团队采用宏基因组技术和基因组步行等技术, 快速、大量捕获不可培养微生物酶基因, 采用生物信息学手段分析了大量生物数据库, 发掘了特定功能的酶, 构建了不同来源、不同性质、可批量生产、数量高达 2 000 多种的具有自主知识产权的酶库, 其中包含氧化还原酶、水解酶、转移酶等^[5-17], 为工业酶制剂的产业化及其应用提供了保障。

2 生物催化剂的定制

随着经济社会的发展, 品种繁多的化学品、

化妆品、医药中间体等需求快速增加,来自自然界的酶通常存在底物谱窄、手性选择性不高、催化效率低、产物不单一、辅酶依赖性强等性能缺陷,难以满足生产需求^[18-20]。新技术、新工具的研究和开发已成为酶工程发展的前沿课题,在此基础上定制高端酶制剂、酶分子机器及细胞工厂,开发新产品,实现生物质资源向高附加值生物基材料、化学品、生物能源等工业产品的转化,已成为酶工程发展的必然趋势。

2.1 酶分子定制

作者团队着眼学术前沿,针对酶工程领域研究瓶颈,开发了一系列用于酶分子定制的新技术和新工具,以推动酶工程领域的快速发展。

酶学研究中的重要工作之一是发现新酶并鉴定其底物谱。但由于酶的底物选择性实验需要合成大量底物并完成大量催化反应以及后续产物分离与分析,耗时费力。作者团队基于酶催化反应的一般催化规律,设计了一套基于分子对接的底物筛选系统,将不可量化评价的构象条件转换成可以量化评价的打分函数,采用 C++ 语言等完成了自动分析软件的编写,可以快速实现对酶的潜在底物的预测。以 CALB 为对象,对文献报道的 100 多个潜在底物进行测试,正确率超过 92%^[21]。

从已有小分子数据库中发现一个全新的有价值的底物的过程存在一个瓶颈,即化合物数据库的限制。目前已知的任何一种构建化合物数据库的方法均不能把已知的和潜在的所有化合物全部包含其中,即使有些化合物可以简单合成,也可能并没有被涵盖。若能将这些数据也囊括在考察范围内,并给出一系列可能的底物,那么对于酶的催化潜力的深度挖掘将很有价值。作者团队从这个角度出发,放弃原有的基于数据库的筛选思路,从酶的结构出发构建合适的底物分子,开发、建立了一套全新的底物分子从头设计软件(*De novo substrate design*)。该方法基于已知的酶与底物的催化机理和结构信息,运用蒙特卡罗算法、

分子力场、组合化学等技术,进行分子片的虚拟生长,搜寻酶的潜在底物分子。该项工作采用了被广泛接受的分子力学建模方法,通过结合理论计算得出的关键催化信息,建立了一种快速、高通量的预测新型底物分子的方法。软件采用 Python 语言编写,整合第三方开源代码,通过 MPI 方式实现了高效的大规模并行计算。该方法被用于 3 个来源与功能完全不同的醛酮还原酶、腈水解酶和脂肪酶,均表现出较高的准确性和可靠性。该软件将推进酶学研究中计算模拟与实验的良好结合,为酶及其催化性质的认知带来更多的可能^[22-23]。

随着高通量测序和定向进化技术、结构生物学和计算生物学的发展,采用定向进化技术、半理性设计和理性设计等手段,依据产业化需求对酶分子进行定制已是酶工程发展的必经之路^[3,24-27]。作者团队依据生物制造产业界提出的技术难题和酶制剂需求,采用上述手段实现了多个酶催化剂的结构与机制解析及设计改造工作,积累了扎实的手性选择性改造与调控技术,定制了多个具备高选择性、高催化活力的新型酶催化剂。

作者团队挖掘获得了一株芳基乙腈类腈水解酶 NIT9,在扁桃腈水解过程中对 S 构型表现出高选择性 (*ee* 值为 49.5%,这已是目前文献报道的最高水平),但与工业应用需求仍有很大差距。通过随机突变结合定点突变、饱和突变及组合突变等技术将其 S 构型选择性提高至 91.7%;更令人兴奋的是,通过揭示酶催化中心半胱氨酸残基的巯基与底物氰基碳原子之间的距离影响了酶的立体选择性,成功地将该酶的对映体选择性反转为 R 构型 (*ee* 值为 90.9%),实现了腈水解酶手性选择性的双向切换。在获得高效催化扁桃腈高选择性生产 R-扁桃酸获得产业化应用的基础上,作者期望进一步定制可催化卤代芳香腈类化合物的酶,通过对酶催化机制的深入研究,揭示了卤素基团的引入所产生的位阻效应是导致已有酶

BCJ2315 催化活力下降的关键因素, 因此改造相应位点的氨基酸以消除位阻成为该脘水解酶理性定制的重要线索, 最终设计方案克服了位阻效应, 提高了脘水解酶 BCJ2315 对邻-氯扁桃脘的催化活力及手性选择性, 催化活力提升为野生型的 376%, *ee* 值提高至 98.7%, 为光学纯 α -羟基酸的生产提供了技术支撑和理论支持, 同时还将该脘水解酶的底物成功拓展到了氟、溴取代及不同位点 (2、3、4 位) 取代的芳香脘类的一系列重要化合物, 其中有很多属于重要药物或前体^[28]。另外, 采用计算生物学和结构生物学手段揭示了脘水解酶具备脘水合酶活性的分子机制, 在此基础上实现了脘水解酶到脘水合酶活力的理性切换^[29], 为酰胺的生产提供了新的思路, 为新酶挖掘提供了新的方法。作者解析了一种来自氧化葡萄糖酸杆菌的羧基还原酶 GoCR 的晶体结构, 采用计算生物学手段阐明了 GoCR 对不同底物立体偏好性与立体识别的分子机制, 预测了结合口袋残基对底物的定位、产物的选择性所起到的关键作用。通过定点突变, 构建了单点突变株 W193A, 其不对称还原 2-氧代-4-苯基丁酸乙酯(OPBE) 生成 (R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯 (R-HPBE) 的 *ee* 值从野生型的 43.2% 提高到 99%。此外, 双点突变株 C93V/Y149A 被证明能够将 GoCR 立体选择性逆转, 生成 S-HPBE (*ee*=79.8%), 成功实现了氧化还原酶 GoCR 手性选择性的双向改造^[30]。作者筛选了多个高性能氧化还原酶并解析了其结构^[31-32], 通过理性设计实现了氧化还原酶 GOX2181 辅酶特异性从 NADH 依赖型到 NADH 和 NADPH 兼容型, 以及氧化还原酶 GOX0502 辅酶特异性从 NADPH 依赖型到 NADH 和 NADPH 兼容型的改造^[31,33-34]。

2.2 多酶自组装

多酶偶联反应体系可以改善底物在多个单一酶间的传递问题, 如缩短中间产物传质距离、提高反应场所中间产物浓度等, 从而提高多酶

级联整体催化效率, 因而, 人工构建高效多酶偶联反应体系成为酶催化领域的热点研究之一。该技术的发展进一步拓展了酶催化的应用空间, 其研究成果在医药、食品、环境保护、生物材料等领域具有广阔的应用前景。完整高效的人工多酶反应体系, 不仅需要多种不同来源、不同功能的酶, 还需从分子比例和空间结构有序等方面考虑多酶的最优化组装, 形成有机的多酶复合体。

近年来, 研究者通过 DNA 支架、蛋白支架、病毒支架、RNA 支架、共固定、层层包埋等, 在胞外成功构建了多个人工多酶反应系统, Liu 等^[35] 利用蛋白相互作用, 成功构建了三元蛋白支架, 并将甲醛脱氢酶、醇脱氢酶、甲酸脱氢酶有序地固定在支架上, 成功地将 NADH 的生成速率提高了 5 倍。胞内无支架自组装效率更高、操作更简便, 可以实现胞内蛋白聚集体的快速规模化制备, 有利于构建具有生物学功能的人工超分子器件, 进而实现产品的工业化生产。作者团队近年来在该方面开展了一系列工作, 利用甲酸脱氢酶 (FDH) 自聚形成二聚体及亮氨酸脱氢酶 (LDH) 自聚形成八聚体的特点结合 SHM 蛋白对的相互作用, 实现了 FDH 和 LDH 在大肠杆菌胞内无支架自组装, 形成了高度有序的多酶聚集体^[36], 将辅酶 NADH 的循环效率提高了一倍多^[37]。利用土曲霉来源的合成衣康酸的关键酶——乌头酸脱羧酶和乌头酸酶分别与 PDZlig 和 PDZ 进行融合, 实现了在大肠杆菌中的共表达自组装, 成功将其静息细胞催化柠檬酸合成衣康酸的产量提高了 3 倍^[38]。通过 SHM 相互作用蛋白的介导, 实现了达玛烯二醇合酶 (PgDDS) 与角鲨烯环氧酶 (ERG1) 在胞内的共同定位, 增强了 PgDDS 对 2,3-氧化角鲨烯的竞争性, 减少了 2,3-氧化角鲨烯的扩散损失, 产量提高了 2 倍^[39]。以氧化葡萄糖酸杆菌为宿主细胞, 通过多酶自组装技术实现了两个参与赤藓糖生物合成的级联酶——异源核糖异构酶 (L-RI)

与该菌细胞膜上的山梨醇脱氢酶 (SDH) 自组装共定位, 构建了赤藓糖一步发酵的重组菌, 大幅提高了赤藓糖在氧化葡萄糖酸杆菌中的产率和产量^[40]。

2.3 细胞工厂

细胞工厂是生物制造的重要技术平台, 为生物资源开发和利用开辟了新途径, 然而微生物代谢过程十分复杂, 往往存在胞内传质效率差、中间代谢物损耗大、目标产物产量低、结构相似副产物多等问题^[41], 在积累了大量酶分子元件并对认知其构效关系及作用机制的基础上, 创制或重构高效的细胞工厂成为可能。作者团队针对甾体药物及萜类化合物合成、多元醇定向转化等方面开展了研究。

甾体药物是仅次于抗生素的第二大类药物, 其合成主要有两种工艺路线: 一种是从黄姜等薯蓣科植物中提取皂素进行化学合成制取双烯等甾体药物核心原料, 进一步合成甾体药物; 另一种通过微生物转化制取雄烯二酮、9-羟基雄烯二酮、雄二烯二酮等甾体药物核心原料, 进一步生产甾体药物。以皂素为原料生产双烯的工艺过程中存在严重的资源和环保问题, 微生物转化工艺可解决或部分解决这些问题, 但微生物合成过程存在副产物多、结构相似不易分离以及母核降解等共性难题, 加之甾醇不溶于水, 微生物对其转化效率十分低下等, 这些问题严重制约了甾体制药工业的整体发展。作者团队基于对甾醇微生物代谢的系统性分析、机制鉴定和代谢通路的调控, 建立了针对甾醇代谢分枝杆菌的靶向性基因编辑平台, 可对目的基因进行有效的敲除或敲入, 创新发展了针对目标产物高选择性且低降解率的理性代谢工程菌种研发技术; 在此基础上, 基于对分枝杆菌细胞被膜在甾醇摄取转化过程中关键作用的认知, 发明了理性改造细胞被膜关键组分的关键技术, 极大提高了微生物水相摄取并转化甾醇的效率。从而成功创制了围绕甾体药物合成的细

胞工厂, 可以生产雄甾烯酮或 C22 羟基孕甾等系列甾体药物中间体^[42-44]。

萜类是重要的化学活性物质, 因其具有抗肿瘤、缓衰老、抗病毒等多种生理功能而被广泛应用于医药、食品、化妆品等领域。目前萜类主要来源于植物提取和化学合成^[45], 首先, 原料来源限制了其广泛应用, 其次, 植物提取的产量和质量易受地域、环境、季节、天气的影响, 加之化学合成过程中使用重金属催化剂、副产物较多、环境影响较大等因素, 使得另辟萜类生产途径尤为迫切, 利用微生物生产萜类化合物已成为引人瞩目的发展方向。作者团队利用基因编辑技术, 采取多个目标酶于特定细胞器区室化表达的策略, 在不同底盘细胞中, 如链霉菌、酿酒酵母及大肠杆菌等, 分别创建了萜类化合物高效合成平台, 目前已在单萜、倍半萜、二萜、三萜等化合物合成方面取得重要突破, 如角鲨烯产量可达到 10 g/L 发酵液。

多元醇作为一种结构多样、应用广泛、生物利用度高的新一代平台化合物而受到高度关注, 然而因其富含活泼且化学性质相似的多个羟基, “特定羟基的选择性转化”是极富挑战性的技术难题。作者团队对生产维生素 C 的菌种之一——氧化葡萄糖酸杆菌开展了长达 30 多年的研究, 通过对该菌代谢机制及醇脱氢酶功能的揭示, 创造性地将该细胞构建成为可选择性氧化多元醇的细胞工厂, 目前已可以催化合成近百种有价值的化合物^[46]。

3 酶与生物催化技术应用

酶催化剂在医药、食品、轻工、化工和环保等领域应用广泛^[4,47], 作者团队基于酶分子机器及细胞工厂的定制开发了阿格列汀、西他列汀等手性胺类医药中间体^[48]、伊鲁替尼、克唑替尼、阿法替尼、他汀类等手性醇类医药中间体^[49-50]、

R-扁桃酸、R-邻氯扁桃酸^[28]等光学纯 α -羟基酸、甾体、米格列醇、手性非天然氨基酸等绿色生产工艺, 实现了酶在医药、精细化学品等领域的产业化应用。

3.1 手性非天然氨基酸

手性非天然氨基酸是合成手性药物及其他手性精细化工品的重要原料。生物催化拆分制备手性非天然氨基酸已经成为国际竞相追逐的产业方向之一。作者团队立足于国内企业的生产现状与国际市场的商业竞争及技术壁垒, 将青霉素酰化酶用于催化拆分制备手性非天然氨基酸, 解决了三大关键技术问题, 实现了众多手性非天然氨基酸的高效生物催化制备^[51-54]。提出了慢速利用碳源、前体成熟因子流加、C/N 源平衡流加和比生长速率调控等策略, 使青霉素酰化酶发酵水平达到国际最高, 创新集成了专用组成型表达技术与渗透提取技术, 使青霉素酰化酶提纯更简单, 利用自主廉价固定化载体及固定化后修饰技术, 使固定化青霉素酰化酶活力更高、稳定性更好, 使青霉素酰化酶适用于几乎所有非天然手性氨基酸的制备, 且立体选择性高、得率高, 在国内多家企业实现了技术转化。

3.2 甾体药物中间体

针对如何推动甾体制药工业向绿色制造转变这一行业重大需求, 作者团队试图利用生物催化转化技术精减改革现有甾体药物的合成路线, 建立基于甾醇转化生产甾体药物的基础工业体系, 从而创建了系列具有自主知识产权的高产能生物催化剂及集成化细胞工厂, 形成了从基础研究到技术发明、再到产业化应用并产生经济效益的完整产业链。作者团队创建了系列高品质甾醇转化微生物细胞工厂和全新水相生产系统, 已实现雄甾烯酮、C22 羟基孕甾和 A/B-环降解物等系列产品的生产, 可用于雄性及蛋白同化激素、肾上腺皮质激素、孕激素、雌激素等近 300 种甾体药物

合成^[42-44]。鉴于这些产品可用于几乎所有临床用甾体药物的合成, 因此, 本项目形成了可覆盖几乎所有甾体药物合成所需前体的完整甾体制药工业体系, 对于我国甾体制药工业企业的产业升级意义重大。通过与企业的产学研合作, 相关技术已在多家知名甾体制药企业得到了应用推广和产业化, 已产生可观的经济和社会效益, 有望打破甾体药物国际大公司在高值药品及其核心技术方面对中国的垄断, 从而破解我国长期以来高污染、低收益的甾体原料出口的困境。

3.3 多元醇及其平台化合物

基于备受关注的新一代平台化合物多元醇及其衍生物, 作者团队利用自主创制的具备选择性氧化多元醇的氧化葡萄糖酸杆菌^[46], 实现了多元醇单一底物到单一产物的定向转化, 创建了以细胞催化剂为核心的酮糖、糖酸、羟基酸等多种产品的合成新途径^[55-56]。在此基础上, 创建了菌体生长和目的酶表达协同进化及膜蛋白高效表达的氧化葡萄糖酸杆菌定向改造技术, 提高细胞催化剂的催化效率, 使细胞催化技术产业化成为可能^[55,57-58]。同时提出了基于溶氧-C/N 平衡培养策略, 实现了细胞催化剂高密度、高活性、低成本生产^[59]; 建立了反应-分离耦合消除酶抑制技术, 实现了工业生产环境下细胞催化剂的高效利用。以上研究形成了包括生物催化法生产米格列醇药物、葡萄糖酸、2-酮基葡萄糖酸、(S)-苯乙二醇、(R)- β -羟基异丁酸、二羟基丙酮等在内的多项产业化成果。

4 结论与展望

生物技术被《“十三五”国家战略性新兴产业发展规划》列为新一代产业新支柱和新增长点^[60], 并提出生物技术惠民工程, 酶工程作为生物技术的核心模块近年来得到快速发展。虽然酶分子定制、新酶挖掘工具的开发、多酶组装、细胞工厂定制等方面已经获得一定进展, 但依然存在较多

问题亟待解决,如更精准的生物催化剂设计工具待开发、细胞工厂代谢途径与机制有待深入解析等。因而在今后的工作中需要不断增强自主创新能力,特别是针对优势资源开发自主的基因编辑技术、酶分子从头设计、理性改造技术及细胞工厂元件装配技术等。同时,加强产学研结合,创新合作机制,充分融合市场敏锐度和科研创新能力,从而推动绿色生物制造工业体系的快速发展。

REFERENCES

- [1] Sheldon RA, Pereira PC. Biocatalysis engineering: the big picture. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(10): 2678–2691.
- [2] Kataoka M, Miyakawa T, Shimizu S, et al. Enzymes useful for chiral compound synthesis: structural biology, directed evolution, and protein engineering for industrial use. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(13): 5747–5757.
- [3] Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, et al. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 2012, 485(7397): 185–194.
- [4] Choi JM, Han SS, Kim HS. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(7): 1443–1454.
- [5] Gao B, Mao YZ, Zhang LJ, et al. A novel saccharifying α -amylase of Antarctic psychrotolerant fungi *Geomyces pannorum*: gene cloning, functional expression, and characterization. *Starch*, 2016, 68(1/2): 20–28.
- [6] Gao WY, Wu K, Chen LF, et al. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 41.
- [7] Chen Y, Yi D, Jiang S, et al. Identification of novel thermostable taurine-pyruvate transaminase from *Geobacillus thermodenitrificans* for chiral amine synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(7): 3101–3111.
- [8] Gao WY, Fan HY, Chen LF, et al. Efficient kinetic resolution of secondary alcohols using an organic solvent-tolerant esterase in non-aqueous medium. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(7): 1165–1171.
- [9] Liu N, Yang M, Mao XZ, et al. Molecular cloning and expression of a new α -neoagarobiose hydrolase from *Agarivorans gilvus* WH0801 and enzymatic production of 3,6-anhydro-L-galactose. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(2): 230–237.
- [10] Sun HH, Gao WY, Wang HL, et al. Expression, characterization of a novel nitrilase PpL19 from *Pseudomonas psychrotolerans* with *S*-selectivity toward mandelonitrile present in active inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(3): 455–461.
- [11] Yang Y, Sun JQ, Wu JJ, et al. Characterization of a novel α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 7 and rational design for its thermostability. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(40): 7546–7554.
- [12] Yang YY, Lin JP, Wei DZ. Heterologous overexpression and biochemical characterization of a nitroreductase from *Gluconobacter oxydans* 621H. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(6): 428–440.
- [13] Zhang BQ, Zheng LD, Lin JP, et al. Characterization of an ene-reductase from *Meyerozyma guilliermondii* for asymmetric bioreduction of α , β -unsaturated compounds. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(9): 1527–1534.
- [14] Zhang GX, Liu P, Zhang L, et al. Bioprospecting metagenomics of a microbial community on cotton degradation: mining for new glycoside hydrolases. *J Biotechnol*, 2016, 234: 35–42.
- [15] Zhao ZQ, Wang HL, Zhang YP, et al. Cloning and characterization of three ketoreductases from soil metagenome for preparing optically active alcohols. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(10): 1799–1808.
- [16] Chen SQ, Cai XH, Xie JL, et al. Structural and biochemical properties of a novel pullulanase of *Paenibacillus lautus* DSM 3035. *Starch*, 2017, 69(1/2): 1500333.
- [17] Cai XH, Chen SQ, Yang H, et al. Biodegradation of waste greases and biochemical properties of a novel lipase from *Pseudomonas synxantha* PS1. *Canad J Microbiol*, 2016, 62(7): 588–599.
- [18] Truppo MD. Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8(5): 476–480.
- [19] Yang HQ, Li JH, Shin HD, et al. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 23–29.
- [20] Goldsmith M, Tawfik DS. Enzyme engineering:

- reaching the maximal catalytic efficiency peak. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 47: 140–150.
- [21] Yao ZQ, Zhang LJ, Gao B, et al. A semiautomated structure-based method to predict substrates of enzymes via molecular docking: a case study with *Candida antarctica* lipase B. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(10): 1979–1994.
- [22] 酶底物虚拟筛选系统(CAESVSS). 国家软件著作权登记号: 2013SR108447.
- [23] 蛋白质热稳定计算设计系统(ETSS). 国家软件著作权登记号: 2013SR108451.
- [24] Jacques P, Béchet M, Bigan M, et al. High-throughput strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Biopro Biosyst Eng*, 2017, 40(2): 161–180.
- [25] Romero-Rivera A, Garcia-Borràs M, Osuna S. Computational tools for the evaluation of laboratory-engineered biocatalysts. *Chem Commun*, 2016, 53(2): 284–297.
- [26] Ebert MC, Pelletier JN. Computational tools for enzyme improvement: why everyone can-and should-use them. *Curr Opin Chem Biol*, 2017, 37: 89–96.
- [27] Damborsky J, Brezovsky J. Computational tools for designing and engineering enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 19: 8–16.
- [28] Wang HL, Gao WY, Sun HH, et al. Protein engineering of a nitrilase from *Burkholderia cenocepacia* J2315 for efficient and enantioselective production of (*R*)-*o*-Chloromandelic acid. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(24): 8469–8477.
- [29] Jiang SQ, Zhang LJ, Yao ZQ, et al. Switching a nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803 to a nitrile hydratase by rationally regulating reaction pathways. *Catal Sci Technol*, 2017, 7(5): 1122–1128.
- [30] Deng J, Yao ZQ, Chen KJ, et al. Towards the computational design and engineering of enzyme enantioselectivity: a case study by a carbonyl reductase from *Gluconobacter oxydans*. *J Biotechnol*, 2016, 217: 31–40.
- [31] Yin B, Cui DB, Zhang LJ, et al. Structural insights into substrate and coenzyme preference by SDR family protein Gox2253 from *Gluconobacteroxydans*. *Prot: Struct Funct Bioinf*, 2014, 82(11): 2925–2935.
- [32] Liu X, Wang C, Zhang LJ, et al. Structural and mutational studies on an aldo-keto reductase AKR5C3 from *Gluconobacter oxydans*. *Prot Sci*, 2014, 23(11): 1540–1549.
- [33] Cui DB, Zhang LJ, Jiang SQ, et al. A computational strategy for altering an enzyme in its cofactor preference to NAD(H) and/or NADP(H). *FEBS J*, 2015, 282(12): 2339–2351.
- [34] Cui DB, Zhang LJ, Yao ZQ, et al. Corrigendum to “Computational design of short-chain dehydrogenase Gox2181 for altered coenzyme specificity” *J Biotechnol*, 2016, 225: 67.
- [35] Liu F, Banta S, Chen W. Functional assembly of a multi-enzyme methanol oxidation cascade on a surface-displayed trifunctional scaffold for enhanced NADH production. *Chem Commun*, 2013, 49(36): 3766–3768.
- [36] Gao X, Zhao CC, Yu T, et al. Construction of a reusable multi-enzyme supramolecular device via disulfide bond locking. *Chem Commun*, 2015, 51(50): 10131–10133.
- [37] Gao X, Yang S, Zhao CC, et al. Artificial multienzyme supramolecular device: highly ordered self-assembly of oligomeric enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Angew Chem*, 2014, 53(51): 14027–14030.
- [38] Yang ZW, Gao X, Xie H, et al. Enhanced itaconic acid production by self-assembly of two biosynthetic enzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 114(2): 457–462.
- [39] Zhao CC, Gao X, Liu XB, et al. Enhancing biosynthesis of a ginsenoside precursor by self-assembly of two key enzymes in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(17): 3380–3385.
- [40] Zou XX, Lin JP, Mao XL, et al. Biosynthesis of L-erythrose by assembly of two key enzymes in *Gluconobacter oxydans*. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(35): 7721–7725.
- [41] Wang Y, Li C. Metabolite transport and process enhancement in cell factories. *Sci Sin*, 2017, 47(5): 544–553.
- [42] Xu LQ, Liu YJ, Yao K, et al. Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholesterol in sterol metabolism. *Sci Rep*, 2016, 6: 21928.
- [43] Yao K, Xu LQ, Wang FQ, et al. Characterization and engineering of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione through the catabolism of sterols.

- Metabo Eng, 2014, 24: 181–191.
- [44] Yao K, Wang FQ, Zhang HC, et al. Identification and engineering of cholesterol oxidases involved in the initial step of sterols catabolism in *Mycobacterium neoaurum*. Metab Eng, 2013, 15: 75–87.
- [45] Paramasivan K, Mutturi S. Progress in terpene synthesis strategies through engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37(8): 974–989.
- [46] Zhang H, Shi LL, Lin JP, et al. Effective improvement of the activity of membrane-bound alcohol dehydrogenase by overexpression of *adhS* in *Gluconobacter oxydans*. Biotechnol Lett, 2016, 38(11): 1131–1138.
- [47] Wang MX. Enantioselective biotransformations of nitriles in organic synthesis. Acc Chem Res, 2015, 48(3): 602–611.
- [48] Zhu SJ, Ma XQ, Su EZ, et al. Efficient hydration of 2-amino-2,3-dimethylbutyronitrile to 2-amino-2,3-dimethylbutyramide in a biphasic system via an easily prepared whole-cell biocatalyst. Green Chem, 2015, 17(7): 3992–3999.
- [49] Wu K, Chen LF, Fan HY, et al. Synthesis of enantiopure epoxide by ‘one pot’ chemoenzymatic approach using a highly enantioselective dehydrogenase. Tetrahedron Lett, 2016, 57(8): 899–904.
- [50] Wu K, Wang HL, Chen LF, et al. Practical two-step synthesis of enantiopure styrene oxide through an optimized chemoenzymatic approach. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(20): 8757–8767.
- [51] Deng SW, Ma XQ, Su EZ, et al. Efficient cascade synthesis of ampicillin from penicillin G potassium salt using wild and mutant penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. J Biotechnol, 2016, 219: 142–148.
- [52] Deng SW, Ma XQ, Sun M, et al. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin using mutant Penicillin G acylase with bio-based solvent glycerol. Catal Commun, 2016, 79: 31–34.
- [53] Deng SW, Su EZ, Ma XQ, et al. Efficient enzymatic synthesis of ampicillin by mutant *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase. J Biotechnol, 2015, 199: 62–68.
- [54] Zhang YW, Wei DZ, Li DC, et al. Optimisation of enzymatic synthesis of cefaclor with *in situ* product removal and continuous acyl donor feeding. Biocatal Biotransf, 2007, 25(1): 59–64.
- [55] Zhang H, Shi LL, Mao XL, et al. Enhancement of cell growth and glycolic acid production by overexpression of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. J Biotechnol, 2016, 237: 18–24.
- [56] Wu J, Wang JL, Li MH, et al. Optimization of immobilization for selective oxidation of benzyl alcohol by *Gluconobacter oxydans* using response surface methodology. Bioresour Technol, 2010, 101(23): 8936–8941.
- [57] Li DH, Lin JP, Wei DZ. Improving *Gluconobacter oxydans* performance in the *in situ* removal of the inhibitor for asymmetric resolution of racemic 1-phenyl-1,2-ethanediol. Bioresour Technol, 2014, 159: 327–333.
- [58] Shi YY, Li KF, Lin JP, et al. Engineered expression vectors significantly enhanced the production of 2-Keto-D-gluconic Acid by *Gluconobacter oxidans*. J Agric Food Chem, 2015, 63(22): 5492–5498.
- [59] Wei GD, Yang XP, Gan TL, et al. High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36(8): 1029–1034.
- [60] 国务院印发《“十三五”国家战略性新兴产业发展规划》[EB/OL]. [2017-04-05]. <http://news.bjx.com.cn/html/20161220/797888.shtml>.

(本文责编 陈宏宇)