

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-010

多酶催化串联策略在复杂天然产物合成中的应用

贺俊斌, 孟松, 潘海学, 唐功利

(中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 结构新颖、复杂多样的天然产物及其衍生物一直是新药发现的重要源泉。然而, 传统的从动植物及微生物中提取分离天然产物的方法往往存在效率低、耗时长、成本高等问题, 极大地制约了新型药物的研发。天然产物的全合成主要包括化学合成和生物合成, 其中体外酶催化合成因其具有催化效率高、反应选择性强、目标产物专一、反应条件简单温和、绿色环保等优点, 为复杂天然产物的合成提供了有效策略。本文总结了近年来采用体外酶催化方法合成复杂天然产物的研究进展, 着重介绍了多酶催化串联方法在聚酮类、生物碱类、萜类、甾体类、大环内酰胺类、核苷类等复杂天然产物合成中的应用, 并对其目前存在的问题以及解决对策进行了讨论, 同时对其未来发展也进行了展望。

关键词: 天然产物; 生物合成; 酶催化; 串联

中图分类号: Q814.9 **文献标志码:** A

Applications of the multienzyme-catalyzed tandem strategy in the synthesis of complex natural products

HE Junbin, MENG Song, PAN Haixue, TANG Gongli

(State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, University of Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Structurally diverse natural products and their derivatives have been an indispensable source for the discovery of new drugs. However, the traditional extraction, isolation and characterization of natural products from animals, plants and microorganisms often have challenges such as low efficiency, time-consuming and expensive cost, which greatly hinder their development as new drugs. The complete synthesis of natural products mainly includes chemical synthesis and biosynthesis. Among them, *In vitro* enzymatic synthesis has the advantages of high catalytic efficiency, high chemo-, stereo- and regio-selectivity, specific product spectrum, simple and mild reaction conditions and environmental friendly, which make it an effective strategy for the synthesis of complex natural products. This paper reviews recent research advances in the synthesis of complex natural products by *in vitro* enzymatic methods,

收稿日期: 2020-02-29 修回日期: 2020-03-17

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (18ZR1448500)

引用本文: 贺俊斌, 孟松, 潘海学, 唐功利. 多酶催化串联策略在复杂天然产物合成中的应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(2): 226-246

Citation: HE Junbin, MENG Song, PAN Haixue, TANG Gongli. Applications of the multienzyme-catalyzed tandem strategy in the synthesis of complex natural products[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(2): 226-246

especially the applications of the multienzyme-catalyzed tandem strategy for synthesis of complex natural products including polyketides, alkaloids, terpenoids, steroids, macrolides and nucleosides. Furthermore, the bottlenecks, corresponding solutions and the perspective of this strategy are discussed.

Key words: natural products; biosynthesis; enzymatic catalysis; multienzyme-catalyzed tandem strategy

结构新颖、复杂多样的天然产物及其衍生物一直以来都是现代药物的重要组成部分和新药发现的重要源泉。研究表明,在1981—2014年间上市的1500多种小分子药物中,超过50%的药物直接或间接来源于天然产物及其衍生物,包括著名的抗疟药青蒿素和抗肿瘤药紫杉醇^[1]。然而,传统的从植物、微生物及动物中提取分离天然产物的方法往往存在步骤繁琐、耗时长、成本高、提取效率低等问题,一定程度上制约了新型药物的研发^[2-3]。因此,人工合成具有重要生物活性、结构复杂、新颖的天然产物具有重要意义。

天然产物全合成主要包括化学合成和生物合成。自1828年德国化学家Wöhler实现尿素的合成以来^[4],天然产物的化学全合成取得了辉煌的成就,化学家们不断挑战合成结构复杂的天然产物,完成了包括维生素B₁₂、海葵毒素、软海绵素等一系列具有里程碑意义的全合成工作^[5-9]。尽管人们能够设计合成自然界存在的几乎任何天然化合物,甚至可以合成理论存在但自然界尚未发现的设想的理论分子,但在一些含有多手性中心、结构复杂的天然产物化学全合成过程中也存在一些问题,如合成步骤繁琐(通常几十步)、产率低(通常<1%)、产物选择性不强、反应条件剧烈、需要昂贵试剂或所用有机溶剂易造成污染、难以实现大量合成等^[10-11]。近年来,随着高通量测序技术、生物信息学、分子生物学等技术的发展,天然产物生物合成取得了巨大的进展。以合成生物学、酶催化合成、组合生物合成为主的生物合成成为复杂天然产物的全合成提供了有效策略^[12-16]。其中,体外酶催化合成因其具有催化效率高、反应选择性强、产物专一性强、反应条件温和、绿色环保等优点^[17-20],吸引了研究人员的关注。本文作者介绍了近年来采用体外酶催化方法合成复杂天然产物的相关研究进展,重点介绍了多酶催化串联法在复

杂天然产物合成中的应用研究进展以及目前存在的问题和解决对策。

1 多酶催化串联法合成复杂天然产物

串联反应提供了一种新的合成思路,其体系是一套经过精心设计的反应系统,每一步反应的产物都作为下一步反应的底物,在整个反应体系中初始底物经过逐步催化后,会最终转化为结构复杂的功能分子。在复杂天然产物的全合成中设计串联反应体系具有可以节省原料、溶剂及催化剂用量、减少反应时间、无需进行每步反应之间的分离纯化步骤等众多优点^[21]。因此,串联反应体系已成为天然产物全合成中的重要合成策略。

酶催化串联反应源于大自然中生命有机体为了维持生命过程而进化出的各种代谢通路。本质上,大自然中的生命体便是一个复杂精妙的一锅多酶串联体系,在这个串联系统中,酶作为催化剂,在多个区间分别参与进行不同的代谢合成反应,多步反应环环相扣,最终形成结构复杂、多种多样的生物活性分子(天然产物)^[22-24]。体外酶催化串联反应可以分为一锅串联、一锅分步串联以及分步串联。一锅串联反应步骤简单、无需分离中间体产物、合成效率高,但有时体系中存在的辅因子或产生的副产物可抑制某些酶的活性。对此,可采用一锅分步串联或分步串联进行解决。然而,一锅分步串联步骤相对繁琐,需要目标中间体产物产生后,才能进行下一步串联反应。此外,分步串联需要中间体产物的分离纯化,且耗时较长。但不管哪种串联方式,相比于化学催化剂,酶作为催化剂的多酶催化串联体系往往具有催化效率高、毒性小、反应条件简单温和以及容易控制、选择性强(化学、立体和区域)、产物构

型专一、省时环保等特点，因而在药物、精细化工品、食品、农化产品等的合成生产中得到了广泛的应用^[17-19, 23, 25-26]。随着测序技术、生物信息学、分子生物学、遗传操作等技术的发展，近年来越来越多结构复杂的天然产物的生物合成途径得到解析，在此基础上研究者们也采用多酶催化串联法成功合成了许多具有重要活性的天然产物。本节就近年来多酶催化串联策略在复杂天然产物合成中的应用作一介绍。

1.1 聚酮类化合物

肠道菌素 (enterocin, **1**) 是由日本科学家于1975年分离于链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 的一种聚酮类抗生素，具有良好的抗菌活性^[27]。随后人们从海洋微生物 *S. maritimus* 中也分离得到肠道菌素 (**1**) 以及聚酮类化合物 wailupemycins^[28]。Moore 课题组^[28-30] 一直从事肠道菌素 (**1**) 的生物合成途径、体外酶催化合成以及类似物合成研究，通过异源表达生物合成基因簇、基因敲除以及体外酶催化实验成功解析了肠道菌素 (**1**) 的生物合成途径。肠道菌素 (**1**) 的生物合成来源于1分子的苯甲酸 (benzoic acid) 和7分子的丙二酸单酰辅酶A (malonyl-CoA)，其生物合成基因簇中并不包括编码环化酶或芳香化酶的基因，而是包含一个编码黄素依赖的氧化酶基因 (*encM*)，该基因负责催化类Favorskii氧化重排反应从而形成肠道菌素 (**1**) 独特的笼状三环和吡喃酮结构。在解析肠道菌素 (**1**) 的生物合成途径后，该课题组通过表达纯化肠道菌素 (**1**) 生物合成途径中的关键酶以及利用商业化的辅因子蛋白，采用一锅分步串联在体外成功合成了肠道菌素 (**1**)，其总产率约25%^[31]。值得一提的是，在体外一锅串联 EncA/B、EncC、EncD 和 EncN 蛋白时，其产物主要以 wailupemycin F (**2**) 和 wailupemycin G (**3**) 为主。随后该课题组又通过不同酶相互串联以及以苯甲酸类似物为底物，成功在体外酶法全合成了8个5-deoxyenterocin (**4**) 类似物和16个 wailupemycin 类似物，其中包括18个新化合物^[32]。肠道菌素 (**1**) 的生物合成、体外酶催化合成以及类似物研究为后来复杂天然产物的生物合成研究提供了很好的思路 (图1)。

Gilvocarcins 是 *S. griseoflavus* G63592 及其他链霉菌产生的一系列具有苯并 [d] 萘 [1, 2-b] 吡喃-6-酮骨架结构的非典型角蕈环聚酮化合物，具有显著的抗肿瘤活性^[33-34]。腊伯罗霉素 (rabelomycin, **5**) 和 defucogilvocarcin M (**6**) 是 gilvocarcin 生物合成途径中的两个中间体^[35-36]。腊伯罗霉素 (**5**) 是1970年分离于橄榄色链霉菌 *S. olivaceus* ATCC 21549 发酵液中的一种角蕈环类抗生素，具有良好的抗革兰氏阳性菌活性^[37]。Rohr 课题组^[38] 利用不同生物合成途径来源的聚酮合酶，即来源于 gilvocarcin、ravidomycin 和杰多霉素 (jadomycin) 生物合成途径，采用多酶催化串联一锅法以乙酰辅酶A (acetyl-coA) 和丙二酸单酰辅酶A为底物在体外成功合成了抗生素腊伯罗霉素 (**5**)。该体系包括6个酶：酮基合成酶 KS_α 和链长因子 KS_β 融合的蛋白 JadAB、酰基载体蛋白质 RavC、酰基载体蛋白质转酰基酶 GilP、聚酮合酶相关的酮基还原酶 GilF、两个环化酶 RavG 和 JadD，经一锅反应2h，腊伯罗霉素 (**5**) 的产率可达80% (图2)。在此基础上，该课题组又将6个不同来源的后修饰酶 (3个加氧酶 GilOI、GilOII 和 JadF、2个甲基转移酶 GilM 和 GilMT 以及1个氧化还原酶 GilR) 与上述聚酮合酶进行串联，并加入了辅因子再生所需的黄素还原酶 (flavin reductase) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase)；通过15个酶进行串联催化，一锅法在体外成功合成了 defucogilvocarcin M (**6**)^[36]。腊伯罗霉素 (**5**) 和 defucogilvocarcin M (**6**) 的体外全酶法合成进一步阐明了 gilvocarcin 生物合成途径中的氧化重排反应，同时也为角蕈环聚酮化合物的全合成提供了新的策略。

司替霉素 (steffimycin) 是1967年分离于斯特菲斯堡链霉菌 (*S. steffiburgensis*) 的一种蕈环类抗生素，具有显著的抑癌作用；presteffimycinone (**7**) 是其生物合成途径中的一个关键中间体^[39-41]。同样地，利用光辉霉素 (mithramycin)、gilvocarcin 和司替霉素生物合成途径中的不同聚酮合酶和后修饰酶，以乙酰辅酶A和丙二酸单酰辅酶A (由丙二酰辅酶A: 酰基载体蛋白质转酰基酶 MatB 合成) 为底物，通过多酶催化串联一锅法在体外成功合成了 presteffimycinone (**7**)，其对确定司替霉素生

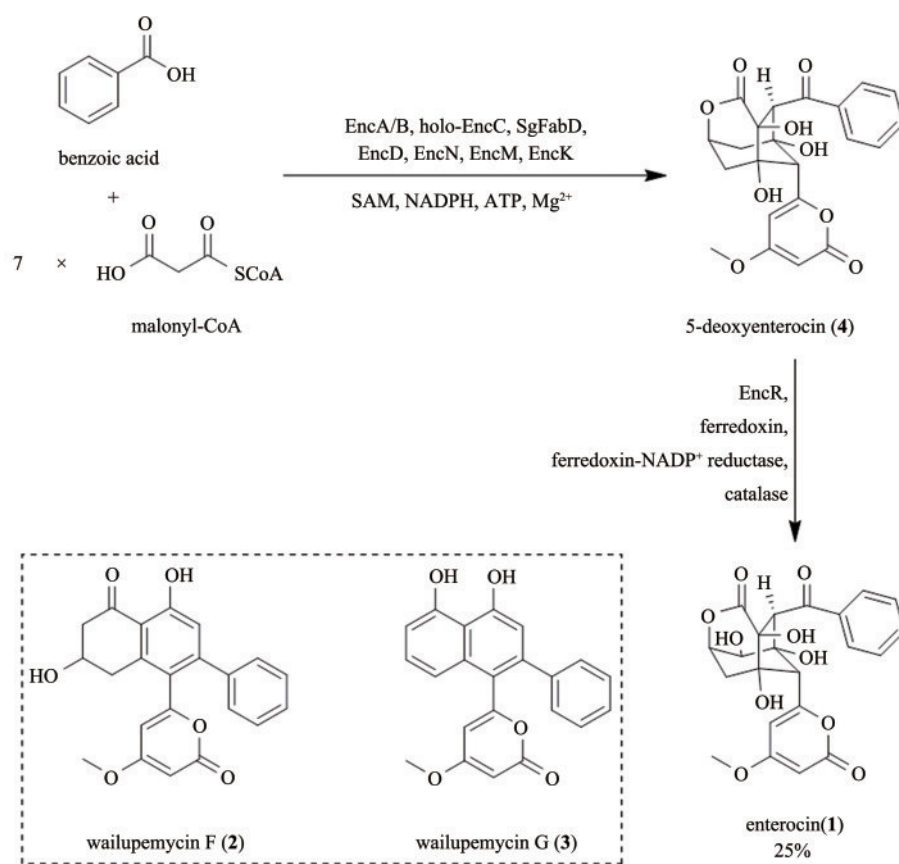


图1 多酶催化串联法合成肠道菌素(1)和 wailupemycins

Fig. 1 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of enterocin (1) and wailupemycins

[SAM, *S*-腺苷蛋氨酸 (*S*-adenosyl methionine); NADPH, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); ATP, 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate); ferredoxin, 铁氧还蛋白; ferredoxin-NADP⁺ reductase, 铁氧还蛋白-NADP⁺还原酶; catalase, 过氧化氢酶]

物合成途径中环化酶 StfX 和酮基还原酶 StfT 的催化顺序提供了新的参考 (图2)^[39-40]。类似地, 聚酮类抗生素特曲霉素 (tetracenomycins) 也通过体外全酶法催化合成^[42-43]。

1.2 生物碱类化合物

赛洛西宾 (psilocybin, 8) 又名裸头草碱、裸盖菇素、光盖菇素, 最早分离于致幻蘑菇 *Psilocybe* 属, 是一种具有神经致幻作用的神经毒素, 结构上属于吲哚生物碱类 (色胺衍生物)^[44-45]。研究表明, 赛洛西宾 (8) 具有潜在的治疗抑郁症等精神疾病以及药物上瘾的效果, 目前正在进行治疗抑郁症的 II 期临床试验^[46-47]。尽管赛洛西宾 (8) 在减轻抑郁症及相关疾病方面具有潜在的应用价值, 但其生物合成途径一直以来未被解析。最近, Fricke 等^[48] 通过体外酶催化实验以及生物转化成功解析了赛洛西

宾 (8) 的生物合成途径, 其主要有 4 个酶参与: 色氨酸脱羧酶 PsiD、细胞色素 P-450 单加氧酶 PsiH、激酶 PsiK 和甲基转移酶 PsiM。进一步的体外多酶催化串联一锅法研究发现, 以 4-羟基-L-色氨酸 (4-hydroxy-L-tryptophan) 为底物, 利用 PsiD、PsiK 和 PsiM 三个酶即可在体外实现赛洛西宾 (8) 的酶法全合成 (图3), 产率约 26%。赛洛西宾 (8) 的体外酶法全合成研究进一步体现了多酶催化串联法在药物合成中的重要应用价值。

苜基异喹啉生物碱 (benzylisoquinoline alkaloids) 是一类结构多样的重要天然产物, 具有抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗病毒、心血管保护以及中枢神经系统等方面的药理活性, 如目前广泛使用的镇痛药吗啡和可待因、抗癌药长春花碱以及具有抗菌消炎作用的小檗碱等^[49-50]。苜基异喹啉生物碱目前主要从开花植物中提取获得, 但存在植物资源匮乏、含量低、提取难度大、纯

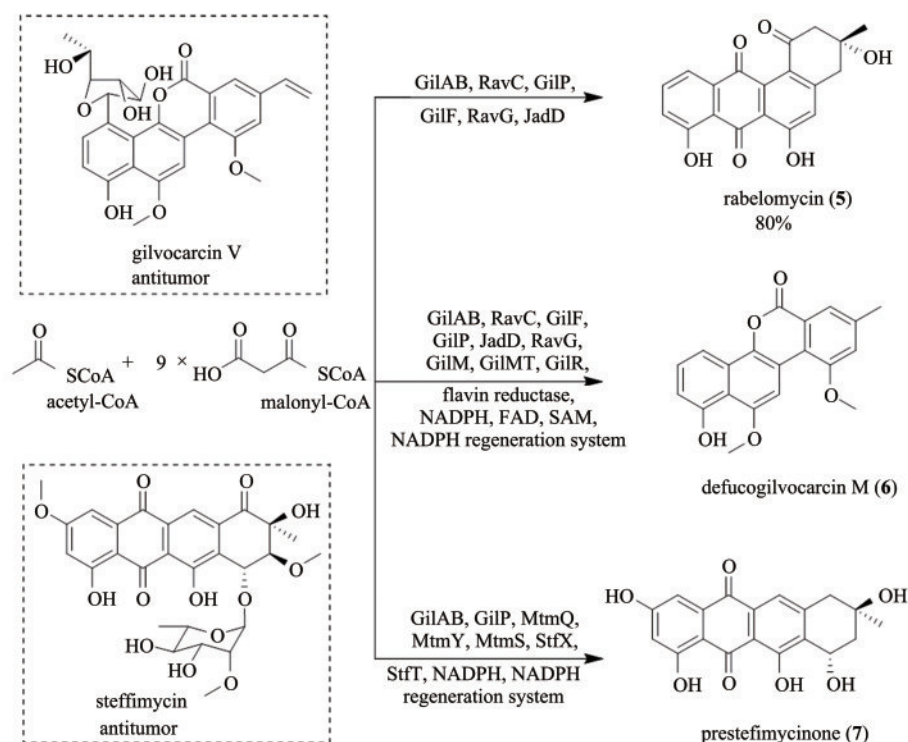


图2 Gilvocarcin V和司替霉素的化学结构及多酶催化串联法合成腊伯罗霉素(5)、defucogilvocarcin M(6)和presteffimycinone(7)

Fig. 2 Chemical structures of gilvocarcin V and steffimycin and the multienzyme-catalyzed tandem synthesis of rabelomycin (5), defucogilvocarcin M (6) and presteffimycinone (7)

[flavin reductase, 黄素还原酶; FAD, 黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide)]

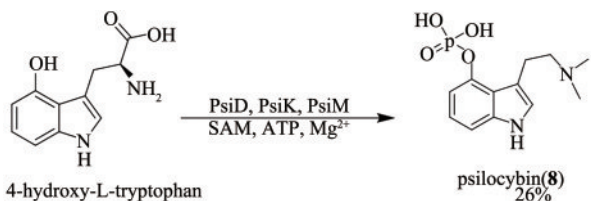


图3 多酶催化串联法合成赛洛西宾(8)

Fig. 3 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of psilocybin (8)

度低等问题;此外,化学全合成又受到产物手性的限制^[49, 51]。生物合成途径上,苄基异喹啉生物碱的合成一般以氨基酸作为初始前体,如酪氨酸,再经过一系列的羟化、脱羧、甲基化、Pictet-Spengler缩合以及氧化还原等酶催化反应生成不同的化合物^[52]。最近,Wang等^[53]通过多酶催化串联反应成功实现了苄基异喹啉生物碱的体外酶法全合成。研究人员首先通过克隆表达与功能验证实验,筛选获得了来源于*Candidatus Nitrosopumilus salaria* BD31中的酪氨酸酶CnTYR

和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis* DC32)的酪氨酸脱羧酶EfTyrDC,随后将它们与来源于紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)的转氨酶CvTam和来源于黄唐松草(*Thalictrum flavum*)的去甲乌药碱合成酶TfNCS进行组合,以L-酪氨酸及其衍生物为底物,通过酶催化串联一锅法或分步串联在体外成功合成了8个高立体选择性的苄基异喹啉生物碱[(9)~(16)],包括6个非天然生物碱;其转化产率约35%~99%,分离产率约23%~66%(图4)。其中,化合物13能达到克级规模的合成,为复杂天然产物的规模化制备提供了重要例子。

Thaxtomin是疮痂病菌代谢产生的一类植物毒素,最早是在1989年分离于感染疮痂病的土豆切片中;thaxtomin系列化合物是一类含有4-硝基吡啶的二酮哌嗪分子,其化学结构的显著特征是4-硝基吡啶和C-羟基-2,5-二酮哌嗪环,差别在于N-甲基、酚羟基以及二酮哌嗪环上羟基的存在与否以及

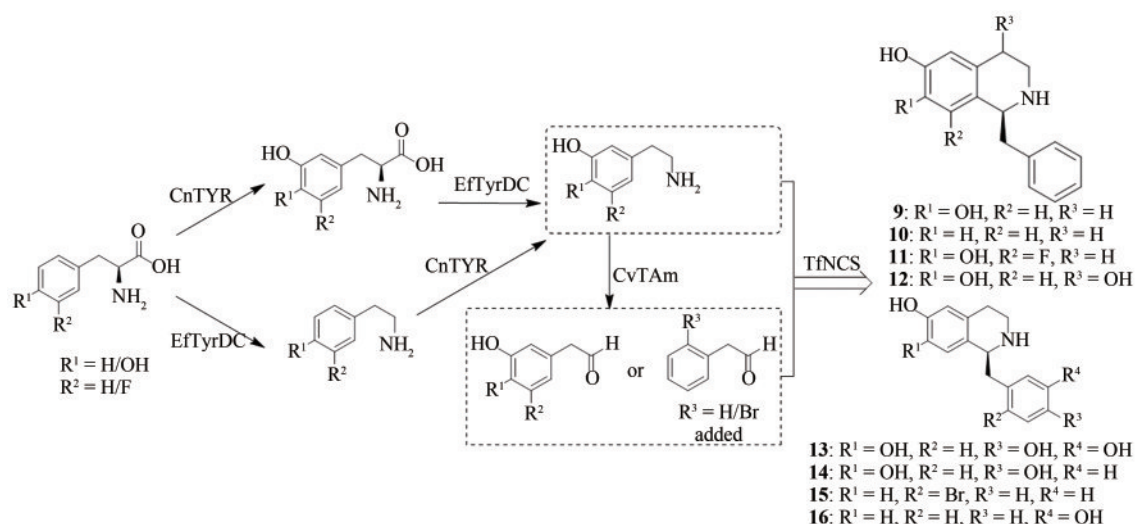


图4 多酶催化串联法合成苯基异喹啉生物碱[(9)~(16)]

Fig. 4 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of benzylisoquinoline alkaloids [(9)~(16)]

取代与否^[54]。因其独特的化学结构组成单元，thaxtomin 家族化合物 [(17)~(21)] 尤其是 thaxtomin A (17) 作为除草剂和挑选耐受疮痂病的土豆品种的筛选剂在农业领域具有潜在的应用价值^[55]。然而在化学全合成 thaxtomin 中仍存在立体或区域选择等挑战，而生物合成为其提供了更有效的策略^[56-58]。Jiang 等^[57] 首先通过体外酶催化实验，确定了 thaxtomin 生物合成途径中 TxA、TxB 和 TxtC 三个酶的功能并考察了它们的底物谱，其中 TxA 和 TxB 是两个非核糖体肽合成酶，它们催化苯丙氨酸和 4-硝基色氨酸合成 *N,N*-二甲基二酮哌嗪环并具有底物宽泛性，而 TxtC 是一个细胞色素 P-450 酶，其可以催化 thaxtomin D (20) 的 C-14 和 C-20 位发生羟基化反应。随后研究人员将这三个酶与 thaxtomin 生物合成途径中负责催化 L-色氨酸 (L-tryptophan) C-4 位发生硝基化反应的 P-450 酶 TxE (嵌合蛋白 TB14) 进行串联，成功在体外通过酶催化全合成了 thaxtomin 化合物 (图 5)。起初将 TB14、TxA、TxB 以及 TxtC 进行串联，以 L-色氨酸和 L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine) 为底物一锅法合成 thaxtomin 化合物，但总转化产率低于 9%，可能与反应体系中存在的 NADPH 再生体系有关。随后他们采用分步串联的策略，即首先串联 TB14、TxA 和 TxB 三个酶，然后再加入 TxtC，thaxtomin 的转化产率可达 47%。通过多酶催化串联一锅法或分步串联一锅法策略，以 L-色氨酸、L-

苯丙氨酸以及它们的类似物为底物，Jiang 等^[57] 在体外实现了 124 个 thaxtomin 化合物的酶催化全合成，且研究表明部分化合物具有显著的除草活性 (IC₅₀ 值小于 2 μmol/L)。Thaxtomin 化合物的体外酶法全合成进一步体现了酶作为催化剂在丰富天然产物结构多样性方面的重要作用。

双环霉素 (bicyclomycin, 22) 是日本科学家于 1972 年从链霉菌中分离获得的一种抗生素，具有显著的抗革兰氏阴性菌活性，也是目前已知的唯一来源于天然产物的转录终止因子 Rho 蛋白的选择性抑制剂^[59-61]。双环霉素 (22) 属于氧杂桥环二酮哌嗪类化合物，其结构特异，可分为三部分：[4, 2, 2] -氧杂桥环骨架、C1 三羟基基团以及 C5=C5a 环外亚甲基 (图 6)。作为一种具有桥环三维结构、脂肪链被高度氧化修饰的活性天然产物，双环霉素 (22) 自发现以来就引起了有机合成化学家的极大兴趣，其最高效且立体专一性的化学全合成是由 Williams 等^[62-63] 完成，整个合成路线有 12 步，总产率约为 4%~5%。作者课题组一直从事复杂天然产物的生物合成研究，最近通过采用在体外重构所有酶催化反应的策略成功解析了双环霉素 (22) 的生物合成途径^[64]。双环霉素 (22) 的生物合成途径包含 7 个酶：1 个环二肽合酶 BcmA、5 个非血红素铁依赖的双加氧酶 BcmB/C/E/F/G 和 1 个细胞色素 P-450 单加氧酶 BcmD。其详细途径在体外通过逐个酶催化的方法解析如下：首先，BcmA 催化一分子异亮氨酰 tRNA 和一分子亮氨酰 tRNA 缩合并环化，

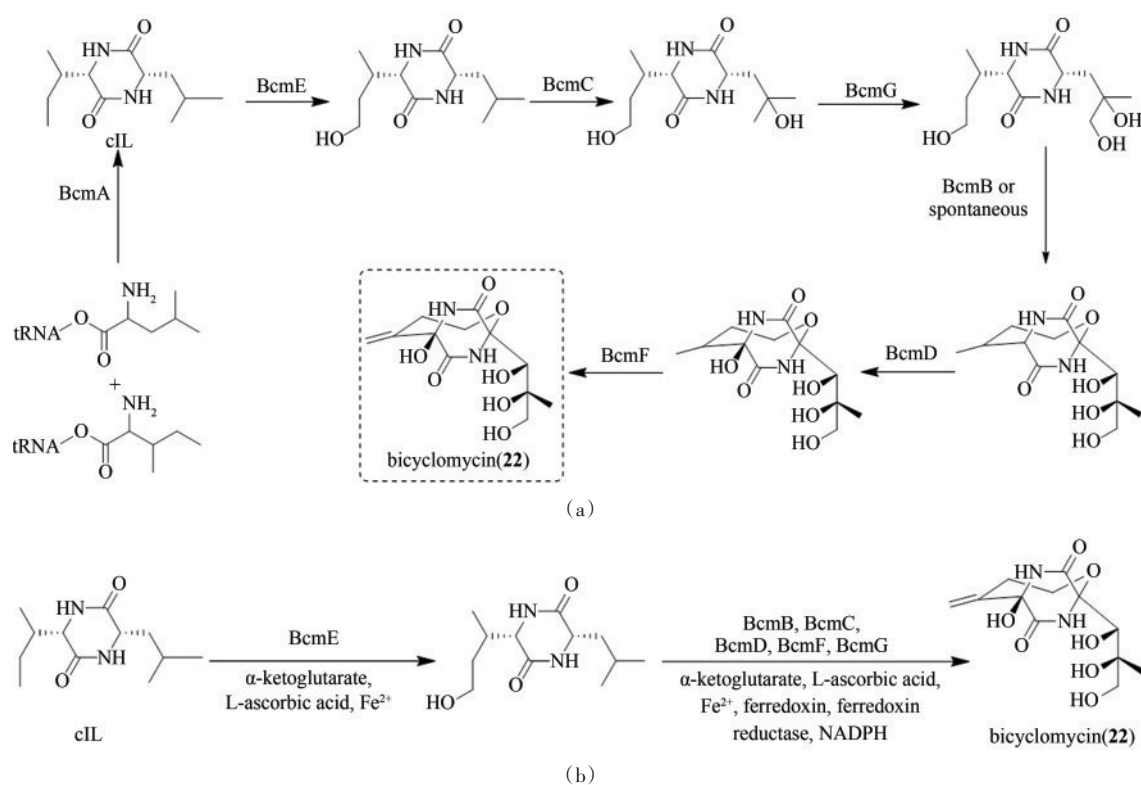


图6 双环霉素(22)的生物合成途径(a)和体外酶催化合成(b)

Fig. 6 Biosynthetic pathway (a) and *in vitro* multienzyme-catalyzed synthesis (b) of bicyclomycin (22)

(α -ketoglutarate, α -酮戊二酸; L-ascorbic acid, 抗坏血酸)

入两个P-450氧化酶KO和KAO以及两个非血红素铁依赖的氧化酶20ox和3ox, 成功合成了赤霉素 GA_4 (23)。同样地, 将上述14个酶进行串联通过一锅法全合成 GA_4 (23)时, 产率为0.15%。

熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA, 24)属甾体胆酸类化合物, 在临床上主要用于治疗胆结石、胆汁淤积性肝病、肝炎、脂肪肝等相关疾病^[67]。UDCA (24)目前主要是由牛或鹅等动物的胆汁中提取的鹅去氧胆酸(epimer chenodeoxycholic acid, CDCA)通过化学半合成获得, 但其产量并不能有效满足临床需求; 生物合成中UDCA (24)则是由羟甾类脱氢酶类(hydroxysteroid dehydrogenases, HSDHs)催化CDCA转化产生^[68-69]。华东理工大学的许建和课题组^[68]最近通过采用酶催化串联一锅法在体外成功实现了CDCA到UDCA的高效转化。研究人员首先鉴定了一个来源于扭链瘤胃球菌(*Ruminococcus torques* ATCC 35915)的自养型羟甾类脱氢酶 7β -HSDH_{Rt}, 随后将该酶与来源于*Clostridium absonum*的自养型羟甾类脱氢酶 7α -

HSDH_{Ca}进行串联, 在体外一锅法实现了从CDCA到UDCA (24)的合成, 产率约73%, 但同时存在中间体产物7-O-石胆酸(7-oxolithocholic acid, 7-oxo-LCA)约5%。为了减少体系中中间体副产物的产生, 研究人员随后将 7α -HSDH_{Ca}替换为来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 7α -HSDH_{Ec}, 采用分步串联一锅法进行UDCA (24)的合成, 即首先由 7α -HSDH_{Ec}和乳酸脱氢酶LDH进行CDCA的第一步氧化反应, 待CDCA完全转化后对 7α -HSDH_{Ec}和LDH进行煮沸灭活; 再加入 7β -HSDH_{Rt}和葡萄糖脱氢酶GDH进行第二步还原反应。通过分步串联一锅法, UDCA (24)的产率可高达98% (图8)。

尽管实现了UDCA (24)的酶法高效合成, 但上述酶催化串联反应随着反应时间的延长, 其体系中副产物7-oxo-LCA会还原为CDCA, 同时热处理灭活 7α -HSDH_{Ec}又耗时繁琐, 大大限制了该法进一步的工业化应用研究。对此, 许建和课题组^[69]又采用了固定化酶技术对UDCA的酶法合成体系进行了优化。固定化酶技术是用物理法或化

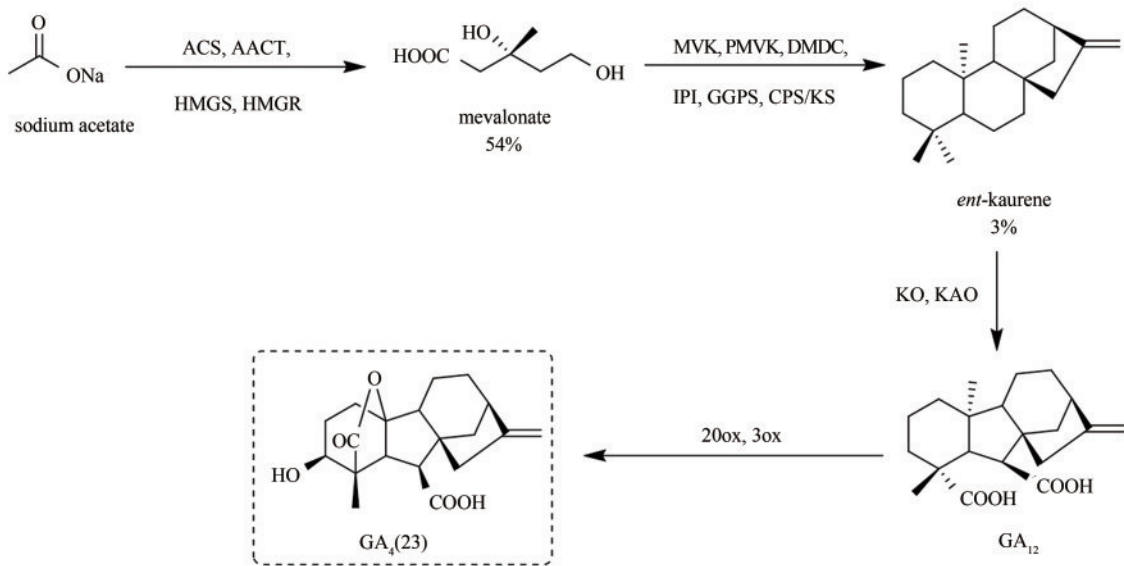


图7 多酶催化串联法合成赤霉素 GA₄(23)

Fig. 7 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of gibberellin A₄ (23)

[ACS, 乙酰辅酶A合成酶 (acetyl-CoA synthase); AACT, 乙酰乙酰辅酶A硫解酶 (acetoacetyl-CoA thiolase); HMGS, 羟甲基戊二酰辅酶A合成酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase); HMGR, 羟甲基戊二酰辅酶A还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase); MVK, 甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase); PMVK, 磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase); DMDC, 二磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (diphosphomevalonate decarboxylase); IPI, 异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase); GGPS, 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase)]

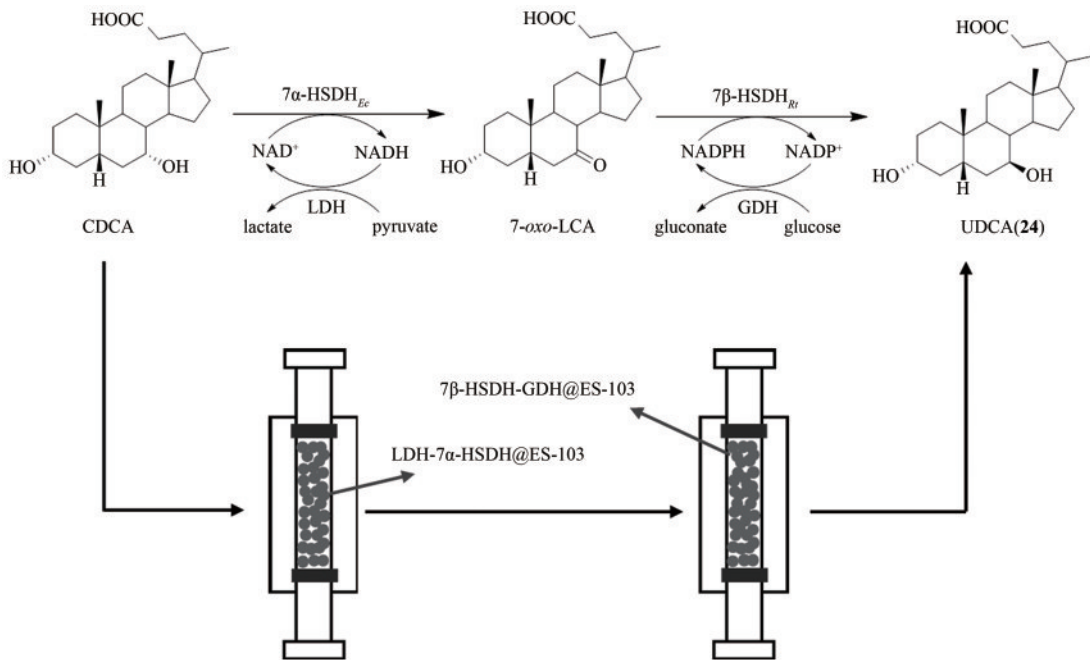


图8 多酶催化串联法合成熊去氧胆酸(24)

Fig. 8 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of ursodeoxycholic acid (24)

(lactate, 乳酸盐; pyruvate, 丙酮酸盐; gluconate, 葡萄糖酸盐; glucose, 葡萄糖)

学法, 将游离酶人工固定在特定载体上进行特有的催化作用, 可回收并长时间使用的一种技术。固定化酶较游离酶具有稳定性高、易于控制、可

反复使用、回收方便、成本低廉等优点, 因此在生物工程、医学、能源开发等领域具有重要作用^[70-71]。许建和课题组首先筛选了不同的固定化方

法, 最后将 7α -HSDH_{Ec} 和 LDH、 7β -HSDH_{Rr-M1} (突变体 T189V/V207I) 和 GDH 分别在环氧化树脂 ES-103 上进行了共固定化, 并对固定化条件进行了优化。随后研究人员设计了一种流动式填充床反应器, 以固定化酶 LDH- 7α -HSDH@ES-103 和 7β -HSDH-GDH@ES-103 为催化剂, 通过优化填充床反应器系统条件, 实现了 CDCA 到 UDCA (24) 的高效转化, 其转化产率高达 100%, 时空产率约 88.5 g/(L·d) (图 8)^[69]。这样一个将固定化技术与酶催化串联法结合大量合成 UDCA (24) 的实例为复杂天然产物的规模化制备提供了新的思路。

1.4 大环内酰胺类化合物

多环特特拉姆酸大环内酰胺 (polycyclic tetramate macrolactams, PoTeMs) 是一类具有特特拉姆酸结构单元及多环体系的大环内酰胺类化合物, 具有多样的生物学活性^[72]。斑鸠霉素 (ikarugamycin, 25) 是第一个报道的 5/6/5 三环 PoTeMs 化合物, 1972 年从嗜色链霉菌 (*S. phaeochromogenes*) 中首次分离获得, 具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗原虫、抗溃疡等生物活性^[73-74]。此外, 斑鸠霉素 (25) 还可抑制巨噬细胞中氧化低密度脂蛋白诱导的摄取以及 HIV-1 Nef 诱导的细胞表面 CD4 受体蛋白的下调, 被认为是一种网格蛋白依赖性的内吞抑制剂^[75-76]。斑鸠霉素 (25) 因其多样的生物活性自发现以来就引起了有机合成

化学家对其全合成的探索。然而, 斑鸠霉素 (25) 结构的高度复杂性在很大程度上限制了高效化学合成方法的探索, 目前化学全合成产率小于 1%^[72, 77]。斑鸠霉素 (25) 的生物合成途径由三个酶负责催化: 杂合聚酮合酶 IkaA (iPKS/NRPS) 负责形成特特拉姆酸 (26)、氧化还原酶 IkaB 负责 5/6 双环体系的形成、乙醇脱氢酶 IkaC 则负责斑鸠霉素 (25) 中内 5 元环的形成^[72, 74]。此外, 斑鸠霉素 (25) 中的环己烯基单元可能是通过自发的 Diels-Alder 反应合成^[72, 74]。Greunke 等^[72]通过采用酶催化串联一锅法在体外成功实现了斑鸠霉素 (25) 的全合成 (图 9)。研究人员首先成功表达了来源于 *Streptomyces* sp. Tü6239 的蛋白 IkaA 和 IkaB 以及来源于 *Salinispora arenicola* CNS-205 的同源蛋白 IkaC。随后以乙酰辅酶 A、丙二酸单酰辅酶 A 和 L-鸟氨酸 (L-ornithine) 为底物, 在反应体系中同时加入 IkaA、IkaB 和 IkaC 以及相关辅因子, 实现了斑鸠霉素 (25) 的体外酶法全合成, 产率约 9%。此外, 为了减少成本, 研究人员将 IkaA、IkaB 和 IkaC 与合成乙酰辅酶 A 的乙酸激酶 AckA 和磷酸转乙酰酶 Pta 以及与丙二酸单酰辅酶 A 合成酶 MatB 进行串联, 一锅法在体外也成功实现了斑鸠霉素 (25) 的酶法全合成。仅利用 3 个酶, 就可构筑斑鸠霉素 (25) 中 15 个 C—C 键、2 个 C—N 键以及 8 个手性中心的形成, 充分展示了酶催化的神奇之处, 也充分体现了酶作为催化剂在复杂天然产物全合成中发挥的强大作用。

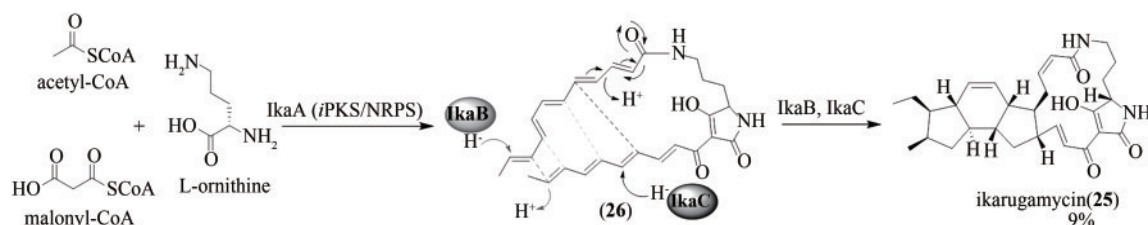


图9 斑鸠霉素(25)的生物合成途径

Fig. 9 Biosynthetic pathway of ikarugamycin (25)

1.5 UK-2A类似物

Fenpicoxamid (商品名 Inatreq) 是陶氏益农公司最新研发的一种新型吡啶酰胺类农用杀菌剂, 其被真菌吸收后可在体内重新转化为 UK-2A^[78]。UK-2A 可特异性地抑制电子传递链泛醌

Q1, 阻断线粒体呼吸作用从而发挥抗真菌作用, 且无交叉耐药性^[79]。研究表明, UK-2A 的抗真菌活性主要来源于其 C-3 位的 3'-羟基-4'-甲氧基吡啶酸结构单元^[80-81]。近日, Tan 等^[82]通过多酶催化串联法成功实现了对 UK-2A 药效官能团 C-3-吡啶甲酸结构的定向改造。研究人员首先通

过挖掘分析 UK-2A 的生物合成基因簇并结合体外酶催化实验鉴定了 7 个关键基因，阐明了 UK-2A 的生物合成途径。其中，C-3-吡啶甲酸结构的合成是通过腺嘌呤核苷酸结合蛋白 UkaF 将 3-羟基吡啶酸 (3'-hydroxypicolinic acid) 上载至肽基载体蛋白 UkaG 上，然后经 P-450 酶 UkaL 和甲基转移酶 UkaN 的修饰形成最后的 C-3 位结构片段。同时，考察 UkaF 的底物谱发现其具有宽泛的底

物杂泛性，可识别 13 种水杨酸 (salicylic acids) 及其衍生物。随后，研究人员通过多酶催化串联一锅法，以 3-羟基吡啶酸或 13 种水杨酸及其衍生物为底物，在体外成功合成了 14 个新的脱酰基 UK-2A (deacyl UK-2A, DAUK-2A) 类似物 [(27)~(40)]，转化产率高达 100%；首次实现了 UK-2A 的 C-3 位官能团的高效定向改造 (图 10)。

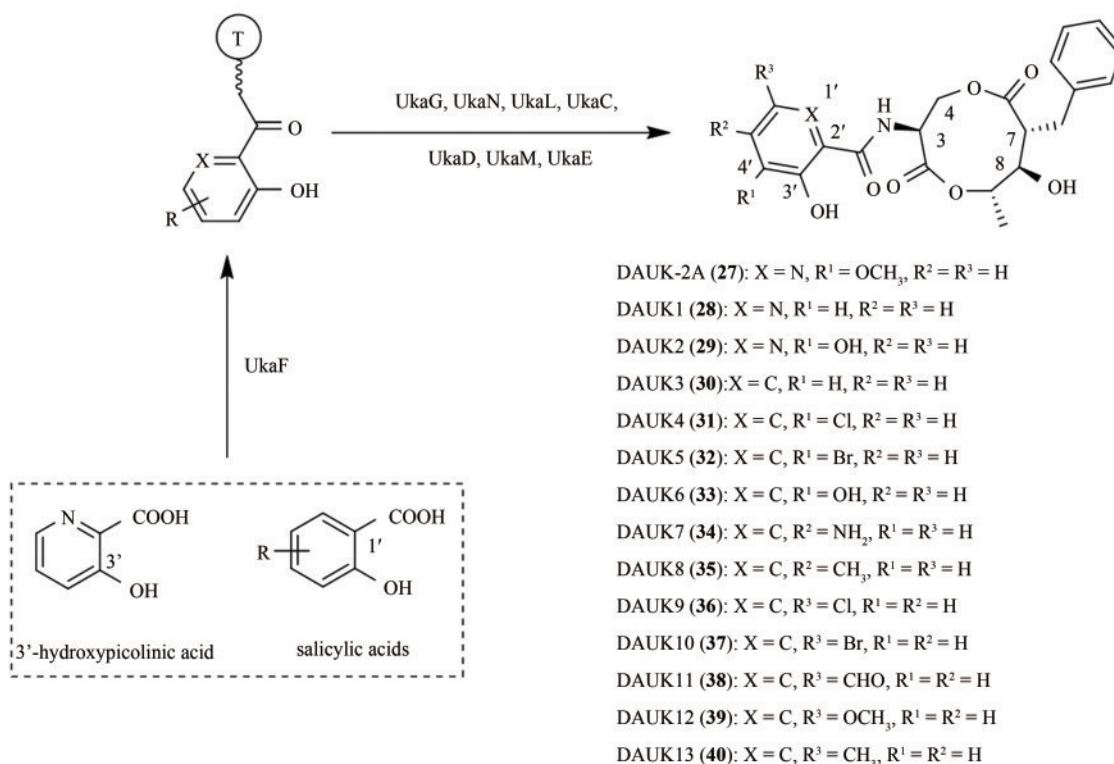


图 10 多酶催化串联法合成 UK-2A 类似物

Fig. 10 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of UK-2A analogues

1.6 核苷类化合物

核苷类似物 islatravir (原名 MK-8591, 41) 是美国默克公司研发的一种 HIV 逆转录酶移位抑制剂，目前正在进行临床试验研究，其非凡的功效和长效的作用有望在降低 HIV 治疗次数和暴露前预防感染中发挥作用^[83-84]。Islatravir (41) 主要通过化学合成获得，但化学合成存在步骤繁琐 (需要 12~18 步) 且效率低等问题，主要在于难以控制 2'-脱氧核糖的立体选择性^[85-86]。鉴于此，Huffman 等^[87]在天然细菌核苷补救途径的启发下，采用逆向合成思路，通过定向进化改造五种天然酶使其作用于非

天然底物，并通过采用多酶催化串联一锅法成功实现了 islatravir (41) 的经济高效合成 (图 11)。

细菌核苷补救途径为脱氧核糖核苷提供了逆向合成方法，该过程主要使用三种酶降解嘌呤 2'-脱氧核糖核苷：嘌呤核苷磷酸化酶 (purine nucleoside phosphorylase, PNP) 用磷酸替换核苷碱基得到脱氧核糖 1-磷酸；随后磷酸戊糖变位酶 (phosphopentomutase, PPM) 将磷酸盐转移至 5 位；所得的 5-磷酸糖在 5-磷酸脱氧核糖醛缩酶 (deoxyribose 5-phosphate aldolase, DERA) 催化下将醛醇缩醛裂解为 3-磷酸甘油醛和乙醛。当逆向合成时，该过程即可从简单的起始底物合成核

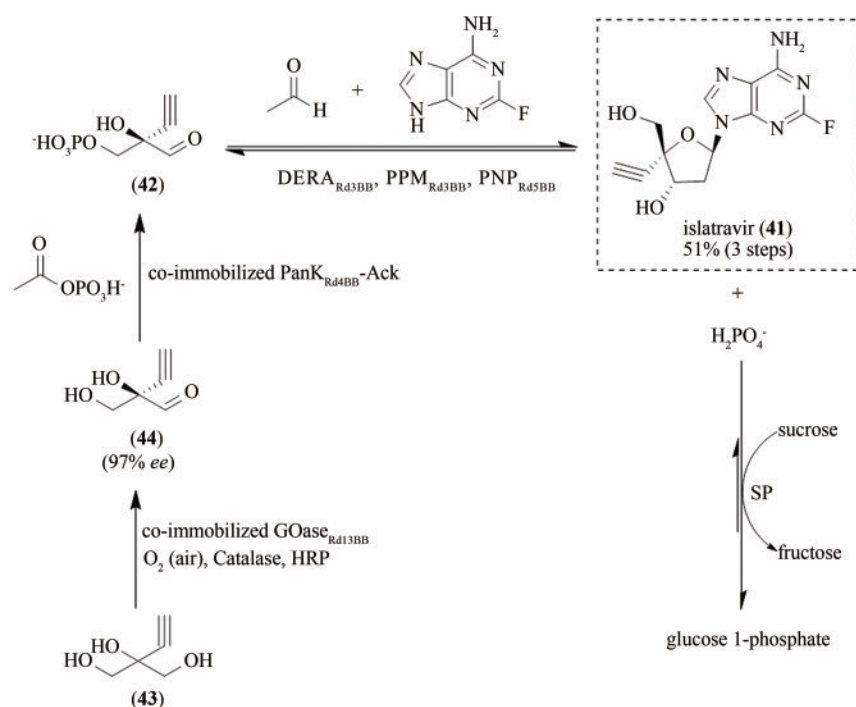


图 11 多酶催化串联法合成 islatravir(41)

Fig. 11 Multienzyme-catalyzed tandem synthesis of islatravir (41)

(fructose, 果糖; glucose 1-phosphate, 葡萄糖-1-磷酸)

昔^[88-89]。基于此, 研究人员充分利用了酶催化反应的可逆性, 采用逆向合成策略进行 islatravir (41) 的合成。然而, islatravir (41) 结构中具有的炔基取代基和氟取代基不易被天然酶所识别。对此, 研究人员首先对核苷补救途径中的三种酶进行了探索研究。通过定向进化改造来源于 *E. coli* 的 PNP 和 PPM 以及来源于希瓦氏菌 (*Shewanella halifaxensis*) 的 DERA, 成功获得了对非天然底物具有高活性高耐盐的 PNP_{Rd5BB} 突变体和高活性的 PPM_{Rd3BB} 突变体, 其活性较野生型酶分别提高了 70 倍和 350 倍; 同时也获得了高选择性以及对乙醛高耐受的 DERA_{Rd3BB} 突变体。由于 PNP 和 PPM 串联的反应被副产物磷酸盐所抑制, 研究人员向反应体系中加入了蔗糖磷酸化酶 (sucrose phosphorylase, SP) 和蔗糖 (sucrose), 以消耗副产物无机磷酸盐, 推动反应平衡。为了合成 3-磷酸-2-炔基甘油醛 (42), 研究人员选择了对 2-乙炔基甘油 (43) 先氧化再磷酸化的路线。通过对 *E. coli* 来源的泛酸激酶 (pantothenate kinase, PanK) 定向进化并将其与海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 来源的热稳定乙酸激酶

(acetate kinase, AcK) 配对, 提高了 PanK 的活性 (较野生型提高 100 倍) 和稳定性, 并实现了 PanK 所需辅因子腺苷三磷酸的再生。在氧化还原酶的筛选中, 研究人员鉴定了禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum*) 来源的半乳糖氧化酶突变体 (galactose oxidase, GOase) 并对其进行定向进化, 获得了具有高活性高选择性的 GOase_{Rd13BB} 突变体。需要注意的是, GOase 催化的反应体系需要额外的过氧化氢酶和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)。

实现了从 2-乙炔基甘油 (43) 到 islatravir (41) 合成的每一步反应后, 研究人员设计了一个 3 步 9 酶催化串联反应 (图 11)。但由于反应体系中引入的酶量较大, 对终产物的过滤造成了困难, 同时体系中的 PanK 可直接催化初始底物 2-乙炔基甘油 (41) 形成副产物。为此研究人员对 PanK (配对 Ack) 和 GOase 进行了酶的固定化操作, 减少了水溶液中的酶量, 并避免了初始底物的直接磷酸化。最终, 通过优化酶催化串联反应平台, 首次实现了 islatravir (41) 的规模化合成, 其总产率高达 51%, 纯度高达 95%^[87]。Islatravir (41) 的

体外酶法高效全合成是酶催化串联法在复杂天然产物合成应用研究中的重大突破，其合成过程中涉及到的逆向合成思维以及定向进化和酶的固定化等策略，为设计合成其他复杂分子提供了新的思路和重要借鉴。

1.7 其他化合物

除上述介绍的重要实例外，采用体外酶催化串联一锅法合成的天然产物还有维生素B₁₂的前体

hydrogenobyric acid (45)^[90]、聚酮化合物灰黄霉素 (griseofulvin, 46)^[91]、杂萜类 merochlorin A (47) 和 merochlorin B (48) 以及 napyradiomycin A1 (49) 和 napyradiomycin B1 (50)^[92-93]、植物抗毒素 camalexin (51)^[94]、吡咯并吲哚类生物碱毒扁豆碱 (physostigmine, 52)^[95]、色氨酸衍生物 indolmycin (53)^[96]、硝基咪唑类抗生素 azomycin (54)^[97]、糖类化合物碳霉糖 (TDP-L-mycarose, 55)^[98]、多肽类抗生素 56^[99]、以及免疫抑制剂 lipid IV_A (57)^[100]，其结构见图12。

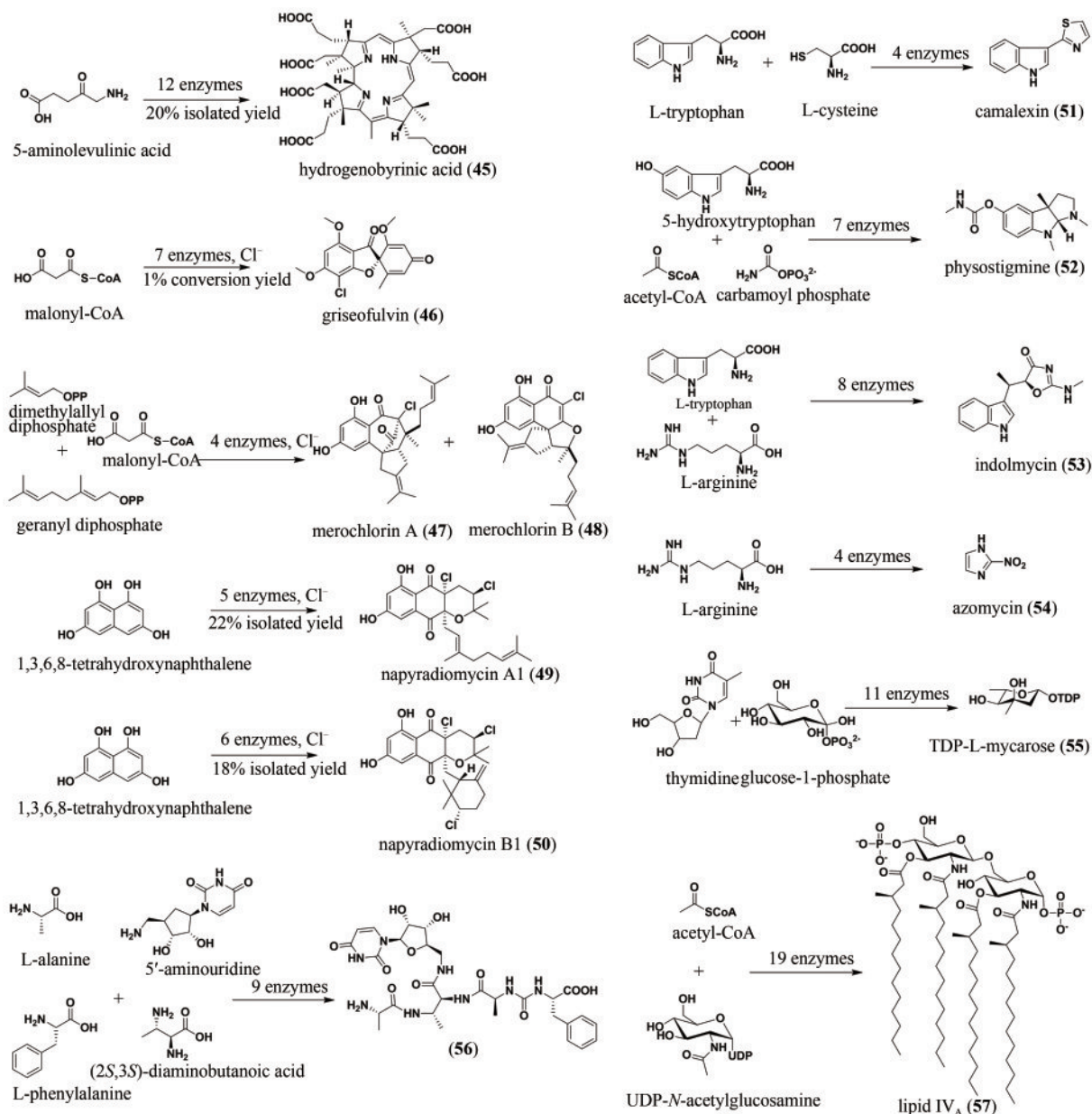


图12 酶催化串联法合成的一些其他化合物(45~57)

Fig. 12 Enzymatic tandem synthesis of other compounds 45~57

2 化学-酶催化串联法合成复杂天然产物

化学-酶催化串联就是将化学合成与酶催化合成进行串联，两者互补，各取所长，从而完成天然产物的合成。化学催化剂如有机金属催化剂具有宽泛的底物适用范围和催化活性，可以弥补某些酶对非天然底物没有催化活性以及在有机溶剂或高温下出现的活性丧失等不足；而酶催化剂能在更加简单温和的催化条件下将区域和立体选择性发挥到极致，可以解决化学催化剂在没有诱导剂或保护基团的辅助下难以实现极高手性选择性的问题。然而，化学-酶催化串联体系的实现较为困难，主要源于两类催化剂所需的催化环境不同；当生物酶和化学催化剂共存于同一反应体系时往往存在相互抑制的情况^[101]。尽管如此，利用酶自身催化反应的高效性、高立体选择性、高区域选择性，以及利用化学催化剂具有的宽广的底物适用范围和催化活性，化学-酶催化串联在复杂天然产物尤其是高手性化合物的合成中发挥了重要作用^[102-106]。近年来，无论是化学-单酶催化串联还是化学-多酶催化串联，在复杂天然产物的合成中均取得了巨大的应用进展^[107-111]。关于化学-酶催化串联法在复杂天然产物合成中的应用研究进展，目前已有相关综述进行了较全面的总结^[101-106, 109]。本节以多杀菌素 A (spinosyn A, **58**)^[111] 和肝素 (heparin)^[107] 的化学-酶催化串联合成研究为例，介绍化学合成与多酶法合成相互结合在复杂天然产物合成中的重要性。

2.1 多杀菌素 A 的合成研究

多杀菌素 A (**58**) 是刺糖多胞菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 产生的大环内酯类化合物，其作为生物杀虫剂多杀菌素的主要活性成分之一，在农业应用中占有重要地位^[112]。多杀菌素 A (**58**) 分子结构复杂，以含有 21 个碳所组成的独特的 5/6/5/12-四环作为基本骨架，并通过氧糖苷键在 C-9 位和 C-17 位分别与三氧甲基鼠李糖和福乐氨糖连接，整个分子中含有 17 个手性中心。多杀菌素 A (**58**) 的化学全合成已

经由 Evans、Paquette、Roush 和 Dai 四个课题组分别独立完成，但由于多杀菌素 A (**58**) 独特的四环结构以及分子中众多的手性中心，在合成过程中给他们带来了巨大挑战^[103, 113]。多杀菌素 A (**58**) 的生物合成途径已被解析 (图 13)：其四环骨架结构 (**59**) 是由模块化 I 型聚酮合酶 SpnA-E 催化 1 分子丙酰辅酶 A、9 分子丙二酸单酰辅酶 A 和 1 分子甲基丙二酸单酰辅酶 A 结合而成；随后在 SpnJ 的催化下将 15-OH 氧化为羰基得到化合物 **60**，并在 SpnM 催化下脱水生成多烯化合物 **61**；化合物 **61** 在 SpnF 催化的 [4+2]-环加成 Diels-Alder 反应中形成化合物 **62**，继而在鼠李糖转移酶 SpnG 作用下进行糖基化，并由 SpnL 催化 C-2 位和 C-14 位相连形成化合物 **63**；化合物 **63** 在甲基转移酶 SpnH、SpnI 和 SpnK 的作用下对鼠李糖单元羟甲基化；最终在 SpnP 的催化下引入福乐氨糖合成最终产物多杀菌素 A (**58**)^[114-116]。

基于化学催化可合成宽广的底物和酶催化反应具有很高的立体选择性和区域选择性，研究人员在 2014 年采用化学-酶催化串联法成功实现了多杀菌素 A (**58**) 的全合成 (图 13)^[111]。由于多杀菌素 A 生物合成途径中化合物 **59** 的结构只是推测而来，尚未分离鉴定，研究人员首先采用化学法合成了多烯大环内酯化合物 **59**。化合物 **64** 通过不对称乙基化和羟醛缩合反应等 5 步转化获得化合物 **65**，随后发生 Stille 偶联、Julia-Kocienski 烯基化以及 Yamaguchi 大环内酯化，经 7 步转化完成了酶催化前体 **59** 的合成。随后研究人员以化合物 **59** 为底物，通过在反应体系中加入多杀菌素 A (**58**) 生物合成途径相关的 8 个酶以及优化体系中各酶的浓度，在体外一锅法实现了化合物 **66** 的合成，其总转化产率约 19.6%，意味着每一步酶催化反应的平均转化产率至少为 81.6%。由于多杀菌素 A (**58**) 生物合成途径中最后一步 SpnP 催化的糖基化反应在体外需要辅助蛋白作用才能发挥活性，而多杀菌素 A (**58**) 生物合成基因簇中并没有相关编码基因存在。因此，研究人员最后采用了化学方法，在 Lewis 酸活化下对化合物 **66** 引入氨基葡萄糖实现了多杀菌素 A (**58**) 的全合成。多杀菌素 A

(58) 的化学-酶催化串联全合成工作充分体现了酶催化反应的高效性、专一性和简便性，同时

也证实了化学合成与生物合成相结合的策略在复杂天然产物合成中的重要价值。

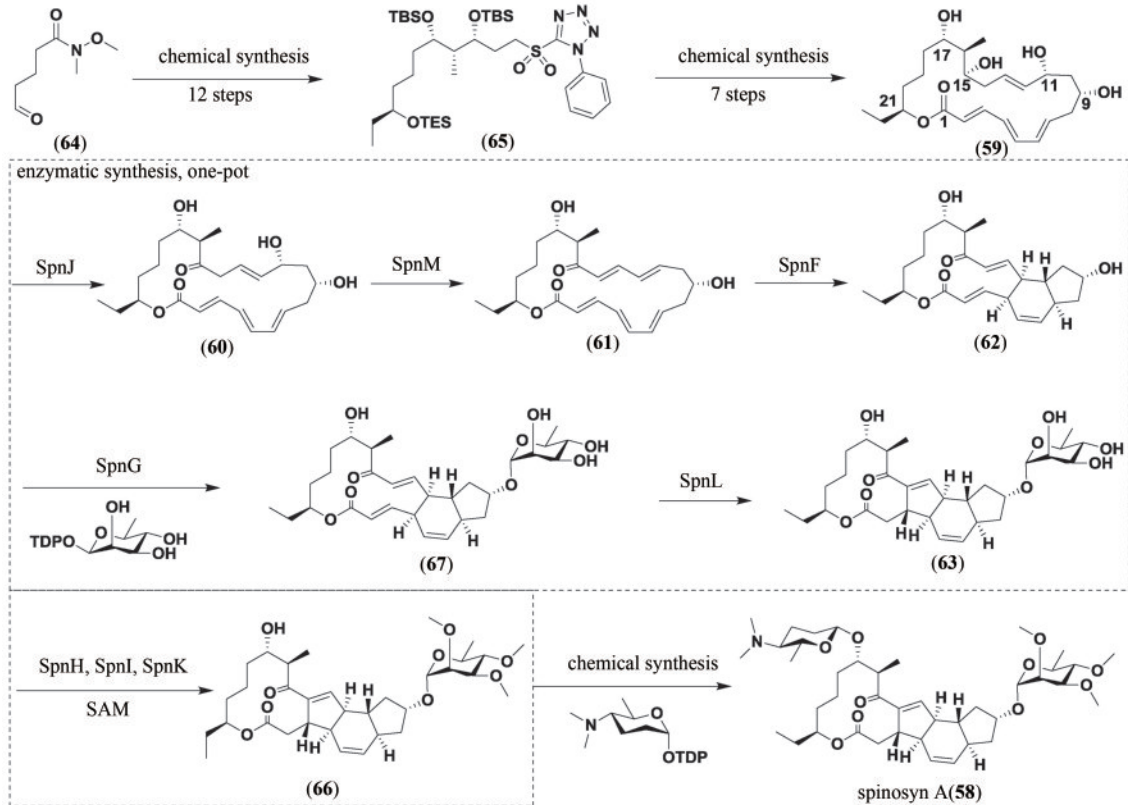


图13 化学-酶催化串联法合成多杀菌素A(58)

Fig. 13 Chemoenzymatic synthesis of spinosyn A (58)

2.2 肝素的合成研究

化学-酶催化串联合成的另一个经典的例子是2011年报道的肝素的全合成^[107]。肝素是临床上广泛使用的抗凝药物，是葡萄糖醛酸 (glucuronic acid, GlcA) 或艾杜糖醛酸 (iduronic acid, IdoA) 和葡萄糖胺 (glucosamine, GlcN) 通过1→4糖苷键连接形成的二糖重复单元组成的糖胺聚糖。肝素大小不一、结构各异，第一个化学全合成的五糖抗凝药磺达肝素 (商品名Arixtra) 总共涉及50多步反应，且反应条件复杂、产率极低 (小于0.1%)，极大地限制了商业化应用^[117-118]。肝素的体内生物合成首先是在N-乙酰葡萄糖胺转移酶 (N-acetyl glucosaminyl transferase) 和肝素合酶 (heparosan synthase-2, HS2) 的作用下形成N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸交替连接的糖链骨架，

随后在N-硫酸化酶 (N-sulfotransferase, NST)、C₅-异构酶 (C₅-epimerase, C₅-epi) 以及不同O-硫酸化酶 (O-sulfotransferase, OST) 的作用下对糖链骨架进行修饰，从而得到不同大小及结构的肝素。利用酶催化反应高效的立体专一性，Xu等^[107]采用化学-酶催化串联法首次实现了两个超低分子量肝素[(68)和(69)]的合成 (图14)。研究人员借助上述不同的糖基转移酶 (来源于*E. coli* K5的KfiA和来源于*Pasteurella multocida*的pmHS2)、硫酸化酶以及C₅-异构酶，通过精细调控反应顺序，将天然葡萄糖胺、葡萄糖醛酸及硫酸根进行“组合”，并结合碱性 (三乙胺, triethylamine) 条件下的脱保护化学过程，只需10~12步反应就高效合成了两个超低分子量肝素[(68)和(69)]，其产率分别为45%和37%，且抗凝血活性与商品药磺达肝素相当。肝素化学-酶法全合成的实现是化学-酶

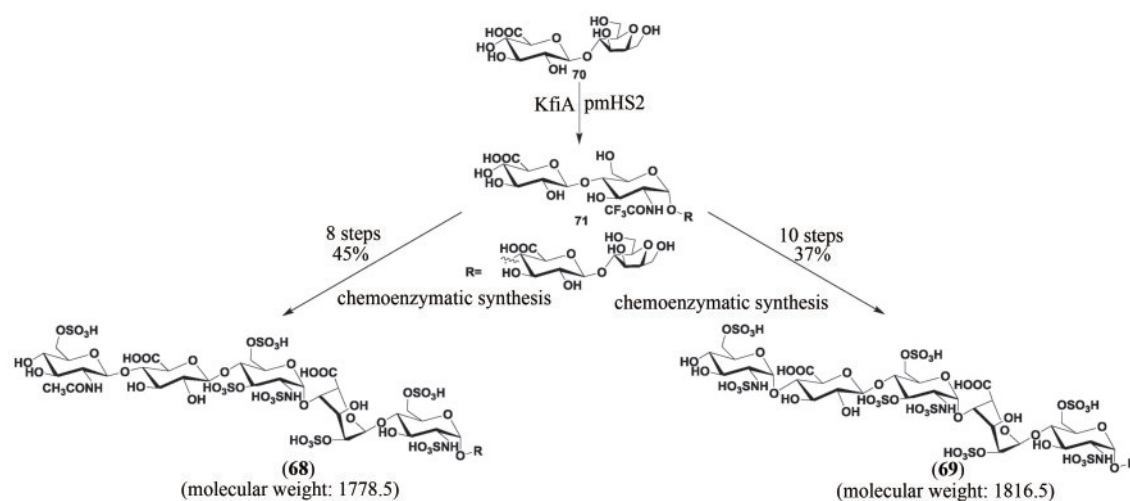


图14 化学-酶催化串联法合成超低分子量肝素(68)和(69)

Fig. 14 Chemoenzymatic synthesis of ultralow molecular weight heparins (68) and (69)

催化串联法在复杂分子合成应用中的里程碑创举，其为抗凝血药物肝素的研究开辟了新的途径。

3 结语

实现天然产物的体外酶法全合成不仅可以拓展“酶”作为催化剂的应用潜力，也为复杂天然产物的制备提供了新的思路。体外酶催化合成具有高效性、高选择性、反应条件温和等优点，在复杂天然产物的合成中发挥了独特的优势。然而，体外酶法全合成的发展仍面临诸多挑战。首先，尽管复杂天然产物的生物合成研究近年来取得了很大进展，但与化学合成相比，人们对于由生物大分子负责的生物合成机制的理解仍显不足。天然产物的体外酶催化全合成需要在其生物合成途径了解的基础上进行，这样才能保证酶催化反应中初始底物的真实性以及酶催化串联反应的有效性。然而一方面天然产物结构多样，另一方面相似化合物的生物合成途径也是共性与差异共存，因此人们还需继续努力挖掘生物合成基因簇和阐明更多的生物合成途径。相信随着测序技术、生物信息学以及基因编辑、结构生物学、遗传转化等生物技术的迅速发展，越来越多复杂天然产物的生物合成途径将得到解析，从而为复杂天然产物的体外酶催化全合成奠定基础。其次，体外酶催化反应的实现需要生物合成途径中所有参与反

应的酶在体外能够稳定获得且有活性，但目前仍有很多目标蛋白无法通过常规的生物技术获得、或蛋白不稳定、或活性很低，极大限制了体外酶催化全合成的应用。另外，复杂天然产物生物合成途径中参与反应的酶的功能多种多样、酶学性质不同，在体外将它们串联在一起时容易出现蛋白互不兼容、反应条件互不合适、中间体产物及辅因子容易抑制一些酶的活性等问题，很大程度上影响了酶催化全合成的效率。对此，可通过优化表达系统、筛选同源基因、构建融合蛋白等来获得目标蛋白；通过优化反应条件、固定化、定向进化等技术提高酶的稳定性和兼容性。此外，也可通过分步串联策略或多酶催化串联流动体系提高蛋白稳定性、减少中间体产物及辅因子对酶活性的抑制，从而最大程度地提高体外酶催化串联体系的合成效率。在体外酶催化途径的设计中，应该综合考虑化学合成和酶催化的优势，不拘泥于全酶串联，在一些特殊步骤中引入化学合成也将大大提高整体合成效率。综上所述，天然产物的体外酶催化全合成研究近年来取得了较大进展，相信随着合成生物学理念的进一步完善，蛋白质工程和酶工程技术的发展，体外酶催化全合成将成为复杂天然产物合成的重要手段之一。

参 考 文 献

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of

- new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3):629-661.
- [2] ATANASOV A G, WALTENBERGER B, PFERSCHY-WENZIG E M, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1582-1614.
- [3] PAULI G F, CHEN S N, FRIESEN J B, et al. Analysis and purification of bioactive natural products: the AnaPurNa study[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(6): 1243-1255.
- [4] WÖHLER F. Ueber künstliche bildung des harnstoffs[J]. *Annalen der Physik*, 1828, 87(2):253-256.
- [5] NICOLAOU K C, VOURLOUMIS D, WINSSINGER N, et al. The art and science of total synthesis at the dawn of the twenty-first century[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2000, 39(1):44-122.
- [6] NICOLAOU K C. Inspirations, discoveries, and future perspectives in total synthesis[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(3):951-972.
- [7] HOFFMANN R W. Natural product synthesis: changes over time[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(1):123-130.
- [8] AICHER T D, BUSZEK K R, FANG F G, et al. Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(8): 3162-3164.
- [9] KAWANO S, ITO K, YAHATA K, et al. A landmark in drug discovery based on complex natural product synthesis[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(8656):1-9.
- [10] 黄伟, 王健博, 唐功利. 天然产物类药物的合成生物学研究[J]. *生命科学*, 2011, 23(9):891-899.
- HUANG W, WANG J B, TANG G L. Synthetic biology toward medicinal natural products[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(9):891-899.
- [11] 马大为, 谢卫青. 天然产物全合成——来自大自然的机遇和挑战[J]. *世界科学*, 2014, (8):51-52.
- MA D W, XIE W Q. Total synthesis of natural products-opportunities and challenges from nature[J]. *World Science*, 2014, (8):51-52.
- [12] 卢志国, 汪建峰, 蒙海林, 等. 合成生物学与天然产物开发[J]. *生命科学*, 2011, 23(9):900-911.
- LU Z G, WANG J F, MENG H L, et al. Synthetic biology and natural products development[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(9):900-911.
- [13] TIBREWAL N, TANG Y. Biocatalysts for natural product biosynthesis[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2014, 5(1):347-366.
- [14] 潘海学, 袁华, 蹇晓红, 等. 天然产物生物合成与抗肿瘤药物合成生物学研究[J]. *中国科学:生命科学*, 2015, 45(10): 1027-1039.
- PAN H X, YUAN H, JIAN X H, et al. Biosynthesis of natural products and synthetic biology of antitumor drugs[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2015, 45(10):1027-1039
- [15] SUN H, LIU Z, ZHAO H, et al. Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 2015(9): 823-833.
- [16] SHELDON R A, WOODLEY J M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 801-838.
- [17] OROZ-GUINEA I, GARCÍA-JUNCEDA E. Enzyme catalysed tandem reactions[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(2):236-249.
- [18] SPERL J M, SIEBER V. Multienzyme cascade reactions—status and recent advances[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(3):2385-2396.
- [19] 范宜晓, 王学恭, 刘庆芬. 酶法技术在发酵类制药中的应用[J]. *生物产业技术*, 2019(2):38-48.
- FAN Y X, WANG X G, LIU Q F. Research and application of enzymatic catalysis technology in fermentative pharmaceuticals[J]. *Biotechnology & Business*, 2019(2):38-48.
- [20] SHODA S, UYAMA H, KADOKAWA J, et al. Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(4):2307-2413.
- [21] 许凡. 酶催化串联方法合成手性分子研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- XU F. Study on enzymatic cascade reaction for the synthesis of chiral compounds[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [22] LOPEZ-GALLEGO F, SCHMIDT-DANNERT C. Multi-enzymatic synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14(2):174-183.
- [23] FERNÁNDEZ-LUCAS J. Multienzymatic synthesis of nucleic acid derivatives: a general perspective[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(11):4615-4627.
- [24] WALSH C T, MOORE B S. Enzymatic cascade reactions in biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(21):6846-6879.
- [25] SANTACOLOMA P A, SIN G, GERNAEY K V, et al. Multi-enzyme-catalyzed processes: next-generation biocatalysis[J]. *Organic Process Research & Development*, 2011, 15(1): 203-212.
- [26] SÁ A G A, DE MENESES A C, DE ARAÚJO P H H, et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 69(1): 95-105.
- [27] MIYAIRI N, SAKAI H, KONOMI T, et al. Enterocin, a new antibiotic[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1976, 29(3):227-235.
- [28] PIEL J, HOANG K, MOORE B S. Natural metabolic diversi-

- ty encoded by the enterocin biosynthesis gene cluster [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(22): 5415-5416.
- [29] PIEL J, HERTWECK C, SHIPLEY P R, et al. Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate '*Streptomyces maritimus*': evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase [J]. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(12):943-955.
- [30] XIANG L, KALAITZIS J A, MOORE B S. EncM, a versatile enterocin biosynthetic enzyme involved in Favorskii oxidative rearrangement, aldol condensation, and heterocycle-forming reactions [J]. *PNAS*, 2004, 101(44):15609-15614.
- [31] IZUMIKAWA M, MELUZZI D, MOORE B S, et al. Enzymatic total synthesis of enterocin polyketides [J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(9):557-558.
- [32] KALAITZIS J A, CHENG Q, THOMAS P M, et al. *In vitro* biosynthesis of unnatural enterocin and wailupemycin polyketides [J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(3):469-472.
- [33] 杜凤翔, 杨靖, 李金洋, 等. 非典型角蕈环聚酮氧化开环酶的功能与进化 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46(2):423-433.
- DU F X, YANG J, LI J Y, et al. Catalysis and evolution of the ring-opening oxygenases in biosynthesis of atypical angucyclines [J]. *Microbiology China*, 2019, 46(2):423-433.
- [34] MATSUMOTO A, HANAWALT P C. Histone H3 and heat shock protein GRP78 are selectively cross-linked to DNA by photoactivated gilvocarcin V in human fibroblasts [J]. *Cancer Research*, 2000, 60(14):3921-3926.
- [35] FISCHER C, LIPATA F, ROHR J. The complete gene cluster of the antitumor agent gilvocarcin V and its implication for the biosynthesis of the gilvocarcins [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(26):7818-7819.
- [36] PAHARI P, KHAREL M K, SHEPHERD M D, et al. Enzymatic total synthesis of defucogilvocarcin M and its implications for gilvocarcin biosynthesis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(5):1216-1220.
- [37] LIU W, PARKER W L, SLUSARCHYK D S, et al. Isolation, characterization, and structure of rabelomycin, a new antibiotic [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1970, 23(9):437-441.
- [38] KHAREL M K, PAHARI P, LIAN H, et al. Enzymatic total synthesis of rabelomycin, an angucycline group antibiotic [J]. *Organic Letters*, 2010, 12(12):2814-2817.
- [39] WANG G, CHEN J, ZHU H, et al. One-pot enzymatic total synthesis of presteffimycinone, an early intermediate of the anthracycline antibiotic steffimycin biosynthesis [J]. *Organic Letters*, 2017, 19(3):540-543.
- [40] GULLÓN S, OLANO C, ABDELFATTAH M S, et al. Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6):4172-4183.
- [41] REUSSER F. Steffimycin B, a DNA binding agent [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 1975, 383(3):266-273.
- [42] SHEN B, HUTCHINSON C R. Enzymatic synthesis of a bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A [J]. *Science*, 1993, 262(5139):1535-1540.
- [43] BAO W, WENDT-PIENKOWSKI E, HUTCHINSON C R. Reconstitution of the iterative type II polyketide synthase for tetra-cenomycin F2 biosynthesis [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(22): 8132-8138.
- [44] 邓永坤, 李辉, 袁芳. 赛洛西宾的毒性与应用 [J]. *中国药物依赖性杂志*, 2007, 2007(6):410-414.
- DENG Y K, LI H, YUAN F. Toxicity and application of psilocybin [J]. *Chinese Journal of Drug Dependence*, 2007, 2007(6):410-414.
- [45] HOFMANN A, HEIM R, BRACK A, et al. Psilocybin und psilocin, zwei psychotrope wirkstoffe aus mexikanischen rauschpilzen [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1959, 42(5): 1557-1572.
- [46] MAHAPATRA A, GUPTA R. Role of psilocybin in the treatment of depression [J]. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2017, 7(1):54-56.
- [47] CARHART-HARRIS R L, BOLSTRIDGE M, DAY C, et al. Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: six-month follow-up [J]. *Psychopharmacology*, 2018, 235(2):399-408.
- [48] FRICKE J, BLEI F, HOFFMEISTER D. Enzymatic synthesis of psilocybin [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(40):12352-12355.
- [49] 刘金凤, 黄鹏, 卿志星, 等. 苯基异喹啉类生物碱生物合成与代谢工程研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(8):2194-2200.
- LIU J F, HUANG P, QING Z X, et al. Advances in the biosynthesis and metabolic engineering research of benzyloisoquinoline alkaloids [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(8): 2194-2200.
- [50] QING Z X, YANG P, TANG Q, et al. Isoquinoline alkaloids and their antiviral, antibacterial, and antifungal activities and structure-activity relationship [J]. *Current Organic Chemistry*, 2017, 21(18): 1920-1934.
- [51] STÖCKIGT J, ANTONCHICK A P, WU F, et al. The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(37): 8538-8564.
- [52] FACCHINI P J, DE LUCA V. Opium poppy and madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants [J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 763-784.

- [53] WANG Y, TAPPERTZHOFEN N, MENDEZ-SANCHEZ D, et al. Design and use of de novo cascades for the biosynthesis of new benzyloisoquinoline alkaloids[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(30):10120-10125.
- [54] 张宏波. 天然产物 Thaxtomin 的全合成研究及活性开发[D]. 天津: 南开大学, 2014.
ZHANG H B. Total synthesis and biological activities discovery of thaxtomin[D]. Tianjin: Nankai University, 2014.
- [55] FRY B A, LORIA R. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 60(1):1-8.
- [56] ZHANG H, NING X, HANG H, et al. Total synthesis of thaxtomin A and its stereoisomers and findings of their biological activities[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(22):5670-5673.
- [57] JIANG G, ZUO R, ZHANG Y, et al. One-pot biocombinatorial synthesis of herbicidal thaxtomins[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(11):10761-10768.
- [58] ZUO R, ZHANG Y, JIANG C, et al. Engineered P450 biocatalysts show improved activity and regio-promiscuity in aromatic nitration[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1-9.
- [59] MIYOSHI T, MIYAIRI N, AOKI H, et al. Bicyclomycin, a new antibiotic[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1972, 25(10):569-575.
- [60] KOHN H, WIDGER W. The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin[J]. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2005, 5(3):273-295.
- [61] LAWSON M R, DYER K, BERGER J M. Ligand-induced and small-molecule control of substrate loading in a hexameric helicase[J]. *PNAS*, 2016, 113(48):13714-13719.
- [62] WILLIAMS R M, ARMSTRONG R W, DUNG J S. Stereocontrolled total synthesis of (\pm)- and (+)-bicyclomycin: new carbon-carbon bond-forming reactions on electrophilic glycine anhydride derivatives[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1984, 106(19):5748-5750.
- [63] WILLIAMS R M, ARMSTRONG R W, DUNG J S. Stereocontrolled total synthesis of (\pm)- and (+)-bicyclomycin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1985, 107(11):3253-3266.
- [64] MENG S, HAN W, ZHAO J, et al. A six-oxidase cascade for tandem C-H bond activation revealed by reconstitution of bicyclomycin biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(3):719-723.
- [65] 彭辉, 施天穹, 聂志奎, 等. 微生物发酵产赤霉素的研究进展[J]. *化工进展*, 2016, 35(11):3611-3618.
PENG H, SHI T Q, NIE Z K, et al. Fermentative production of gibberellins: a review[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2016, 35(11):3611-3618.
- [66] SUGAI Y, MIYAZAKI S, MUKAI S, et al. Enzymatic total synthesis of gibberellin A₄ from acetate[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(1):128-135.
- [67] POUPON R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action[J]. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2012, 36(s1):S3-S12.
- [68] ZHENG M, WANG R, LI C, et al. Two-step enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid with a new β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus torques*[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(4):598-604.
- [69] ZHENG M M, CHEN F F, LI H, et al. Continuous production of ursodeoxycholic acid by using two cascade reactors with co-immobilized enzymes[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(4):347-353.
- [70] ROMERO-FERNÁNDEZ M, PARADISI F. Protein immobilization technology for flow biocatalysis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 55(1):1-8.
- [71] REN S, LI C, JIAO X, et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 373(19):1254-1278.
- [72] GREUNKE C, GLOCKLE A, ANTOSCH J, et al. Biocatalytic total synthesis of ikarugamycin[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(15):4351-4355.
- [73] JOMON K, KURODA Y, AJISAKA M, et al. A new antibiotic, ikarugamycin[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1972, 25(5):271-280.
- [74] ZHANG G, ZHANG W, SAHA S, et al. Recent advances in discovery, biosynthesis and genome mining of medicinally relevant polycyclic tetramate macrolactams[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16(15):1727-1739.
- [75] HASUMI K, SHINOHARA C, NAGANUMA S, et al. Inhibition of the uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophage J774 by the antibiotic ikarugamycin[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 205(2):841-846.
- [76] LUO T, FREDERICKSEN B L, HASUMI K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced CD4 cell surface downregulation is inhibited by ikarugamycin[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(5):2488-2492.
- [77] ROUSH W R, WADA C K. Application of. eta. 4-diene iron tricarbonyl complexes in acyclic stereocontrol: asymmetric synthesis of the as-indacene unit of ikarugamycin (a formal total synthesis)[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(5):2151-2152.
- [78] OWEN W J, YAO C, MYUNG K, et al. Biological characterization of fenpicoxamid, a new fungicide with utility in cereals and other crops[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(10):2005-2016.
- [79] YOUNG D H, WANG N X, MEYER S T, et al. Characterization of the mechanism of action of the fungicide fenpicoxamid and its metabolite UK-2A[J]. *Pest Management Science*, 2018, 74(2):489-498.

- [80] USUKI Y, MITOMO K, ADACHI N, et al. Semi-synthesis and biological evaluation of analogues of UK-2A, a novel antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. 517-02[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(8):2011-2014.
- [81] USUKI Y, ADACHI N, FUJITA K, et al. Structure - activity relationship studies on UK-2A, a novel antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. 517-02. Part 5: roles of the 9-membered dilactone-ring moiety in respiratory inhibition [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(12):3319-3322.
- [82] TAN H, YANG X, DAI Q, et al. Unravelling the biosynthetic flexibility of UK-2A enables enzymatic synthesis of its structural variants[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(12):2659-2665.
- [83] MICHAELIDIS E, HUBER A D, RYAN E M, et al. 4'-Ethylnyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) inhibits HIV-1 reverse transcriptase with multiple mechanisms [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(35):24533-24548.
- [84] MARKOWITZ M, GROBLER J A. Islatravir for the treatment and prevention of infection with the human immunodeficiency virus type 1[J]. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2020, 15(1):27-32.
- [85] FUKUYAMA K, OHRUI H, KUWAHARA S. Synthesis of EFdA via a diastereoselective aldol reaction of a protected 3-keto furanose[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(4):828-831.
- [86] MCLAUGHLIN M, KONG J, BELYK K M, et al. Enantioselective synthesis of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) via enzymatic desymmetrization [J]. *Organic Letters*, 2017, 19(4):926-929.
- [87] HUFFMAN M A, FRYSZKOWSKA A, ALVIZO O, et al. Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir[J]. *Science*, 2019, 366(6470):1255-1259.
- [88] TURNER N J, O'REILLY E. Biocatalytic retrosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(5):285-288.
- [89] MIKHAILOPULO I A, MIROSHNIKOV A I. New trends in nucleoside biotechnology [J]. *Acta Naturae*, 2010, 2(5):36-59.
- [90] ROESSNER C A, SPENCER J B, STOLOWICH N J, et al. Genetically engineered synthesis of precorrin-6x and the complete corrinoid, hydrogenobyrinic acid, an advanced precursor of vitamin B₁₂[J]. *Chemistry & Biology*, 1994, 1(2):119-124.
- [91] CACHO R A, CHOOI Y H, ZHOU H, et al. Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: a spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin [J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(10):2322-2830.
- [92] TEUFEL R, KAYSSER L, VILLAUME M T, et al. One-pot enzymatic synthesis of merochlorin A and B[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(41):11019-11022.
- [93] MCKINNIE S, MILES Z D, JORDAN P A, et al. Total enzyme syntheses of napyradiomycins A1 and B1 [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(51):17840-17845.
- [94] KLEIN A P, ANARAT CAPPILLINO G, SATTELY E S. Minimum set of cytochromes P450 for reconstituting the biosynthesis of camalexin, a major *Arabidopsis* antibiotic [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(51):13625-13628.
- [95] LIU J, NG T, RUI Z, et al. Unusual acetylation-dependent reaction cascade in the biosynthesis of the pyrroloindole drug physostigmine[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(1):136-139.
- [96] DU Y, ALKHALAF L M, RYAN K S. *In vitro* reconstitution of indolmycin biosynthesis reveals the molecular basis of oxazolinone assembly[J]. *PNAS*, 2015, 112(9):2717-2722.
- [97] HEDGES J B, RYAN K S. *In vitro* reconstitution of the biosynthetic pathway to the nitroimidazole antibiotic azomycin [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(34):11647-11651.
- [98] TAKAHASHI H, LIU Y, LIU H. A two-stage one-pot enzymatic synthesis of TDP-L-mycarose from thymidine and glucose-1-phosphate[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(5):1432-1433.
- [99] ZHANG W, NTAI I, BOLLA M L, et al. Nine enzymes are required for assembly of the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(14):5240-5243.
- [100] SANKARANARAYANAN K, ANTARIS X X, PALANSKI B A, et al. Tunable enzymatic synthesis of the immunomodulator Lipid IV_A to enable structure-activity analysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(24):9474-9478.
- [101] DENARD C A, HARTWIG J F, ZHAO H. Multistep one-pot reactions combining biocatalysts and chemical catalysts for asymmetric synthesis[J]. *ACS Catalysis*, 2013, 3(12):2856-2864.
- [102] SCHRITTWIESER J H, VELIKOGNE S, HALL M, et al. Artificial biocatalytic linear cascades for preparation of organic molecules[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1):270-348.
- [103] 李晓军, 张万斌, 高栓虎. 复杂天然产物全合成: 化学合成与生物合成结合的策略[J]. *有机化学*, 2018, 38(9):2185-2198.
- LI X J, ZHANG W B, GAO S H. Total synthesis of complex natural products: combination of chemical synthesis and biosynthesis strategies [J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2018, 38(9):2185-2198.
- [104] 赵淑玲, 谷耀华, 薛屏. 化学-酶法高选择性合成手性化合物的研究进展[J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(4):473-482.

- ZHAO S L, GU Y H, XUE P. Recent progress on chemo-enzymatic synthesis of chiral compounds with high stereoselectivity [J]. *Chemical Research and Application*, 2014, 26(4):473-482.
- [105] 李龙, 邱贵森, 蒋泰龙, 等. 化学酶法合成盐酸度洛西汀的研究进展[J]. *化工进展*, 2014, 33(7):1839-1843.
- LIL, QIU G S, JIANG T L, et al. Research progresses in chemo-enzymatic synthesis of Duloxetine hydrochloride[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014, 33(7):1839-1843.
- [106] KING-SMITH E, ZWICK III C R, RENATA H. Applications of oxygenases in the chemoenzymatic total synthesis of complex natural products [J]. *Biochemistry*, 2018, 57 (4) : 403-412.
- [107] XU Y, MASUKO S, TAKIEDDIN M, et al. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins[J]. *Science*, 2011, 334(6055):498-501.
- [108] BAKER DOCKREY S A, LUKOWSKI A L, BECKER M R, et al. Biocatalytic site- and enantioselective oxidative dearomatization of phenols [J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10 (2) : 119-125.
- [109] MORRILL L A, SUSICK R B, CHARI J V, et al. Total synthesis as a vehicle for collaboration [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(32):12423-12443.
- [110] LAZZAROTTO M, HAMMERER L, HETMANN M, et al. Chemoenzymatic total synthesis of deoxy-, *epi*-, and podophyllotoxin and a biocatalytic kinetic resolution of dibenzylbutyrolactones [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(24):8226-8230.
- [111] KIM H J, CHOI S H, JEON B S, et al. Chemoenzymatic synthesis of spinosyn A[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(49):13553-13557.
- [112] KIRST H A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(3):101-111.
- [113] CAI X, BAI Y, DAI M. Total syntheses of spinosyn A [J]. *Synlett*, 2018, 29(20):2623-2632.
- [114] 张敏, 戴均贵. 微生物来源 Diels-Alder 型加合物生物合成研究进展[J]. *药学进展*, 2018, 42(1):21-38.
- ZHANG M, DAI J G. Progress in the biosynthesis of Diels-Alder adducts of microbial origin[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2018, 42(1):21-38.
- [115] WALDRON C, MATSUSHIMA P, ROSTECK JR P R, et al. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa* [J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(5):487-499.
- [116] KIM H J, RUSZCZYCKY M W, CHOI S, et al. Enzyme-catalysed [4+2] cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A [J]. *Nature*, 2011, 473 (7345) : 109-112.
- [117] PETITOU M, VAN BOECKEL C A A. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next?[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43 (24): 3118-3133.
- [118] LIU J, LINHARDT R J. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31 (12): 1676-1685.



通讯作者:唐功利(1971—),男,博士,研究员,主要从事天然产物生物合成和化学生物学研究。
E-mail:gltang@sioc.ac.cn



第一作者:贺俊斌(1992—),男,博士,博士后,主要从事天然产物生物合成研究。
E-mail:jbhe@sioc.ac.cn