

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-028

## 天然产物的化学-酶法合成：方法与策略的演进

张守祺, 王涛, 孔尧, 邹家胜, 刘元宁, 徐正仁

(北京大学药学院, 天然药物及仿生药物全国重点实验室, 北京 100191)

**摘要:** 天然产物是小分子药物和探针的重要来源, 其合成研究一直以来是有机合成中一个备受关注而又极具挑战性的领域。随着色谱分离技术和结构分析技术的不断发展, 微量活性天然产物的发现速度不断加快, 其结构的多样性和复杂性也不断增加, 而对其构效关系、靶标鉴定、体内活性等方面的研究则需要供应足够量的天然产物, 因而对天然产物的合成在效率、经济性和规模等方面都提出了更高的要求。化学-酶法的方式为天然产物的合成研究提供了多维的视角, 一方面提供了高效高选择性的酶催化合成方法, 另一方面, 酶催化反应的引入可以给原先合成策略的设计模式带来突破, 并快速、高效地实现天然产物的多样化合成, 从而成为近期研究的热点。其中酶催化反应如何有机地整合到天然产物的合成中便成为目前化学-酶法合成成功的关键, 本文从当前天然产物化学-酶法的合成实践中总结了酶催化反应所发挥的三方面作用: ①对合成起点的改变, 即酶催化反应可以在合成原料中引入关键的手性中心或官能团, 以体外酶促或体内发酵的方式提供复杂的合成前体, 如多取代芳(杂)环、手性池等; ②合成后期通过酶催化方式对多官能团底物或复杂骨架的惰性位置进行化学、区域和立体选择性的官能团化; ③酶催化反应作为关键步骤在母核骨架构建中关键碳碳键形成方面的策略性应用。最后, 本文从合成策略的设计、合成方法的开发以及研究人员思维等三个方面讨论了化学-酶法策略在当下所面临的挑战和未来的发展趋势。在此背景下, 化学合成与生物催化等多学科手段的深度交叉融合将为天然产物的合成科学带来新的活力。

**关键词:** 天然产物; 化学-酶法合成; 生物催化; 生物合成; 后期官能团化

**中图分类号:** Q816 **文献标志码:** A

## Chemoenzymatic synthesis of natural products: evolution of synthetic methodology and strategy

ZHANG Shouqi, WANG Tao, KONG Yao, ZOU Jiasheng, LIU Yuanning, XU Zhengren

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Natural product is an important source of small-molecule drugs and probes, but its synthesis is challenging and has attracted lasting attention in the field of organic chemistry. With the continuous advancement of

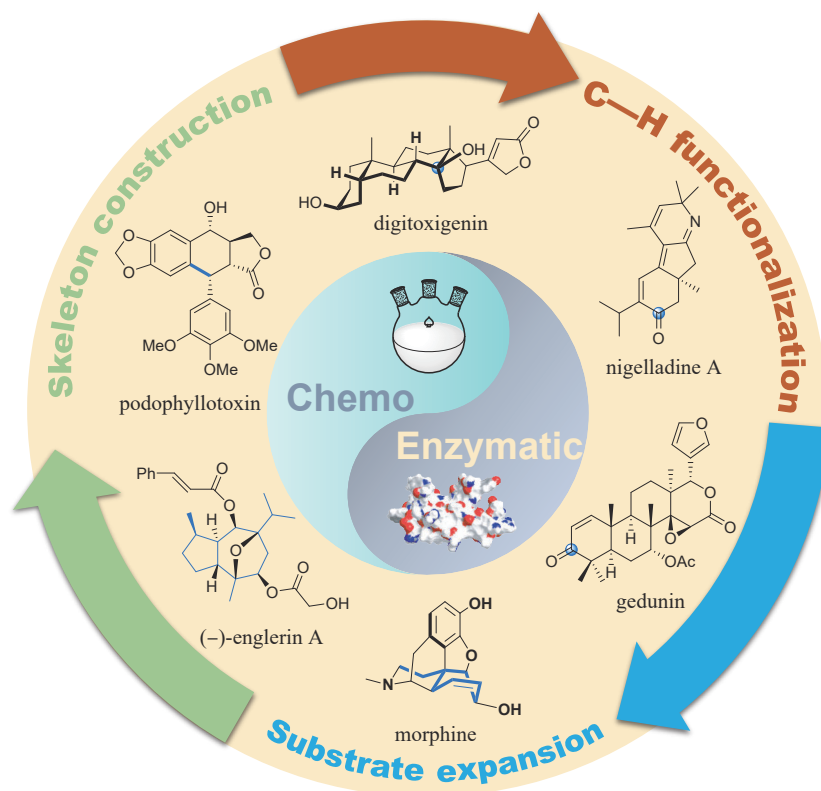
收稿日期: 2024-03-25 修回日期: 2024-05-28

基金项目: 国家自然科学基金 (81991525, 81973197)

引用本文: 张守祺, 王涛, 孔尧, 邹家胜, 刘元宁, 徐正仁. 天然产物的化学-酶法合成: 方法与策略的演进[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 913-940

Citation: ZHANG Shouqi, WANG Tao, KONG Yao, ZOU Jiasheng, LIU Yuanning, XU Zhengren. Chemoenzymatic synthesis of natural products: evolution of synthetic methodology and strategy[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 913-940

chromatographic techniques for separation and spectroscopic methods for structural analysis, the pace of discovering tiny bioactive natural products is accelerating, concomitantly leading to an increase in the diversity and complexity of the newly identified structures. However, to meet the demand of the quantity for the study of their structure-activity relationships, target identification, *in vivo* activity evaluation, *etc.*, growing challenges in the requirement for the synthetic efficiency, economy, and scalability of natural products are emerging. Synthetic practices in a chemoenzymatic way have provided multi-dimensional visions for natural product research, which emerged as a hot research topic in recent years. On the one hand, enzymatic catalysis has provided highly efficient and selective synthetic methodologies that would complement traditional synthetic methods. On the other hand, the introduction of enzyme-catalyzed reactions would bring a new mode of strategic design for synthesis, enabling the rapid and diverse synthesis of natural products with high efficiency. In this context, how to integrate the enzyme-catalyzed reactions into the synthesis of natural products is the key to a successful chemoenzymatic synthesis. We herein summarized three roles played by the applications of enzyme-catalyzed reactions in the current practices of chemoenzymatic synthesis of natural products. ① The involvement of biocatalysis would introduce a chiral center or a key functional group into the starting material, or supply complex synthetic precursors (*e.g.*, polysubstituted (hetero)aromatics, chiral pools, *etc.*) via *in vitro* enzyme-catalyzed reactions or fermentation, hence advancing the starting line of synthesis; ② Late-stage enzyme-catalyzed chemo-, regio-, and stereoselective modifications of substrates with heavily substituted functional groups or inert positions of complex skeletons; ③ The strategic application of enzymatic catalysis as a key carbon-carbon bond-forming step in the construction of the skeleton of natural product. Finally, we have also discussed the current challenges and future trends of the chemoenzymatic synthesis of natural products in three facets, including the design of synthetic strategy, the development of synthetic methods, as well as persons involved in the research. Thus, the integration of interdisciplinary methods and technologies, including chemical synthesis and biocatalysis, would invigorate the synthesis of natural products.



**Keywords:** natural product; chemoenzymatic synthesis; biocatalysis; biosynthesis; late-stage functionalization

天然产物是小分子药物、先导化合物和小分子探针的重要来源之一<sup>[1-3]</sup>。据统计,过去40多年FDA批准上市的小分子药物中,约有一半是直接或间接来源于天然产物及其衍生物。随着色谱分离技术和结构解析技术的不断发展,从更广泛来源的生物物种中发现了越来越多新颖而且具有复杂多样结构的微量活性天然产物<sup>[4]</sup>。然而,大多数新发现的活性天然产物的提取量仅在毫克或亚毫克级别,其可获得性成为限制后续天然药物研究的瓶颈问题之一<sup>[5-8]</sup>。

鉴于对活性天然产物及其类似物不断增长的可获得性需求,当前研究在合成的规模、效率以及经济性等方面对天然产物的制备提出了更高的要求<sup>[9-12]</sup>,结合合成生物学和合成化学两方面的技术和手段的合成科学为天然产物合成策略的设计与方法的开发提供了更多维的解决方案。天然产物的化学-酶法合成是其中的代表之一,而如何有机整合酶催化反应用于天然产物合成便成为其中的关键。

天然产物的化学-酶法合成可以追溯至20世纪初,早期的研究主要聚焦于利用野生型菌株对特定底物的生物转化,以及利用已知酶的体外反应体系来促进化学反应。在这一阶段,水解酶和氧化还原酶等在手性底物合成方面的应用尤为突出,并大大促进了天然产物不对称合成的发展。随着对酶活性和稳定性的深入了解,一些酶催化的反应也开始广泛地应用于制药、食品加工、纺织等工业领域<sup>[13]</sup>。近三十年来,随着分子生物学、生物合成和生物催化等相关领域研究的进展,酶的挖掘、发现、鉴定、改造等技术门槛日趋降低,将酶催化反应用于天然产物合成的实践也越来越多,并且酶催化步骤能实现足够的规模来支持天然产物的合成<sup>[14]</sup>。因此,酶作为一种反应条件温和、选择性高的高效催化剂,目前在技术条件

和现实需求上都可以并且正在成为天然产物合成的理想助力工具<sup>[15-18]</sup>。其优势主要体现在以下两个方面:①酶催化反应的高效、高选择性为天然产物的合成提供了新的方法,不但可以简化合成前体的制备,还可以在温和的条件下对具有复杂结构的天然产物进行后期选择性修饰,如对惰性键的定点官能团化;②酶催化反应的引入改变了对天然产物的逆合成分析,特别是策略性地借鉴生物合成中参与天然产物关键骨架构建的酶催化反应,可以设计高效合成策略,从而简化合成路线<sup>[19]</sup>。

本文并非对天然产物化学-酶法合成进行全面综述,而是结合近期的合成实践,尝试从以下三个方面来阐述酶催化反应的引入如何影响天然产物合成的方法开发和策略创新(图1)。之前关于天然产物的化学-酶法合成已有基于不同角度的综述发表,感兴趣的读者可以参考近期的相关综述以及其中引用的文献<sup>[20-26]</sup>;另外,由于篇幅所限,本文未能包含所有相关的优秀工作,我们对此深表歉意。

(1) 合成前体/原料的制备 通过引入酶催化反应,或通过工程化的异源宿主进行发酵或生物转化,制备多样的起始原料和合成前体,比如含特定手性中心的原料或含多取代芳环的前体等,从而改进或改变了天然产物的合成起点,进而缩短合成路线。

(2) 选择性后期官能团化反应 利用酶催化反应的高化学、区域和立体选择性,对复杂天然产物的骨架进行精准的修饰,特别是对惰性碳氢键的活化,从而实现天然产物后期的选择性官能团化和多样性衍生化。

(3) 关键碳碳键和复杂多环骨架的形成 利用酶催化反应在成键和成环等反应上的优势,特别是借鉴天然产物生物合成过程中的关键骨架合

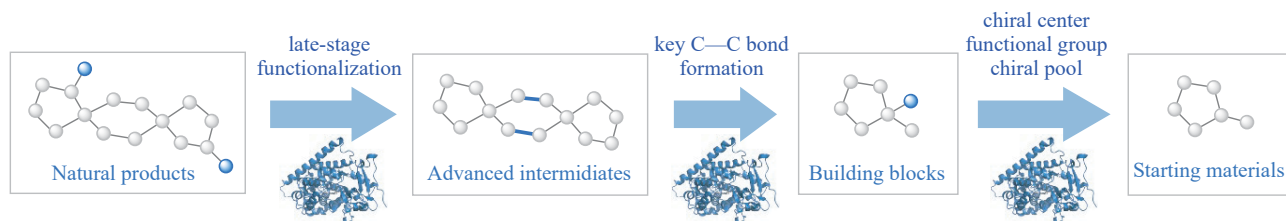


图1 酶催化反应在天然产物化学-酶法合成中的应用

Fig. 1 Applications of enzyme-catalyzed reactions in chemoenzymatic synthesis of natural products

成酶，从而在策略层面为复杂天然产物的合成提供新的思路。

## 1 酶催化反应改进或改变天然产物合成的起点

一般情况下，天然产物合成的起点为简单易得的可售原料，或者是能从生物体中大量提取的天然产物。前者是一般的化工产品，种类丰富，但是结构相对简单，而且一般不具有手性中心；起点于此的天然产物合成，关键骨架的构筑和相应手性中心的引入成为其关注的重点。后者我们一般称之为手性池<sup>[27]</sup>，常见的有萜类、氨基酸类、糖类等，它们本身已具有多样的结构类型和多个手性中心；起点于此的天然产物合成（也称为半合成）能够在具有一定复杂环系底物的基础上缩短合成路线，提高合成效率，另外还能促进合成化学家们关注于骨架构筑之外的方法学创新。但手性池策略受到提取原料的限制，目前可供选择的起始原料种类有限，从而直接影响后续合成策略设计中起点的选择。

在这样的背景下，酶催化反应可以在两个层面介入天然产物合成的起点。一方面，作为高效的催化剂，酶可以立体选择性地简单底物上引入适当的官能团或手性中心，为天然产物的合成提供所需的起始原料；这里官能团或手性中心的引入可以由常规的合成化学方式实现，酶催化反应的引入并不改变整体的合成策略，而只是提高了合成的效率，改进了合成的起点。另一方面，无论通过体外酶催化反应的方式，还是发酵或生物转化的方式，将简单底物快速转化为结构多样的复杂前体，这在很大程度上能克服天然产物合成过程中起始原料来源的局限性，特别是突破了手性池原料的多样性限制，不仅为后续的合成提供更灵活多变的起始原料，而且对合成策略的设计提供了新的角度，从而改变了合成的起点。

本文接下来将按照上述酶催化反应介入天然产物合成起点的两个层面，分别以酶催化反应引入关键手性中心或官能团，以及酶催化反应制备合成前体的顺序，来介绍化学-酶法如何改进或改变天然产物合成的起点。

### 1.1 酶催化反应引入底物的关键手性中心

天然产物通常含有多个手性中心，而关键手性中心的引入是其合成的重点之一，也是合成化学领域研究的热点之一。在含手性醇、氨基、羧酸等前体化合物的制备方面，研究者已经发展了一系列包括过渡金属催化、有机催化、手性辅基诱导等不同类型的合成方法；同时生物催化在该领域也得到了长足的发展，并且能满足从实验室研究到工业生产等不同规模的制备<sup>[28-33]</sup>。对含有手性中心的消旋体进行拆分来获得光学纯的化合物是目前应用最广泛的类型，这主要包括动力学拆分（kinetic resolution）和动态动力学拆分（dynamic kinetic resolution）等方式，而常用的生物催化剂包括酯酶、蛋白酶、环氧水解酶、酰胺水解酶、氰基水解酶等水解酶。另外，对含有前手性中心或前手性面的化合物/官能团进行对映选择性反应也是引入关键手性中心的重要方式，目前常用的生物催化剂包括酮基还原酶、烯基还原酶、氨基酸脱氢酶、甲苯双加氧酶、黄素依赖单加氧酶等氧化还原酶，以及转氨酶等。

动力学拆分主要根据酶对消旋体中两个对映异构体反应速率的差异，从而将其进行区分，因此动力学拆分策略的理论产率不会超过50%。在动力学拆分的过程中，如果对底物进行持续的消旋化，那么该动态动力学拆分过程理论上能够使消旋的底物立体专一性地完全转化为单一的手性产物，即理论产率为100%。例如Shuji Akai等<sup>[34]</sup>发展了一个以介孔二氧化硅（MPS）固定化的氧钒助催化剂（V-MPS），可以对消旋的烯丙醇底物进行消旋化，即烯丙醇**1**和**3**在V-MPS的催化下可以经过烯丙基碳正中间体**2**进行相互转化；而异构体**3**可以在*Burkholderia cepacia*脂肪酶PS-IM的作用下与乙酸乙烯酯（**4**）进行酯交换，该动态动力学拆分过程可以88%的产率、高于99%的对映体过量（ee）值，得到乙酰化烯丙醇**5**。中间体**5**再经后续**4**步转化即完成了imperanene（**6**）的合成，这是从禾本科植物白茅（*Imperata cylindrica*）中分离得到的具有抑制血小板聚集活性的酚类天然产物<sup>[35]</sup> [图2(a)]。

对含有前手性中心的底物分子进行去对称化

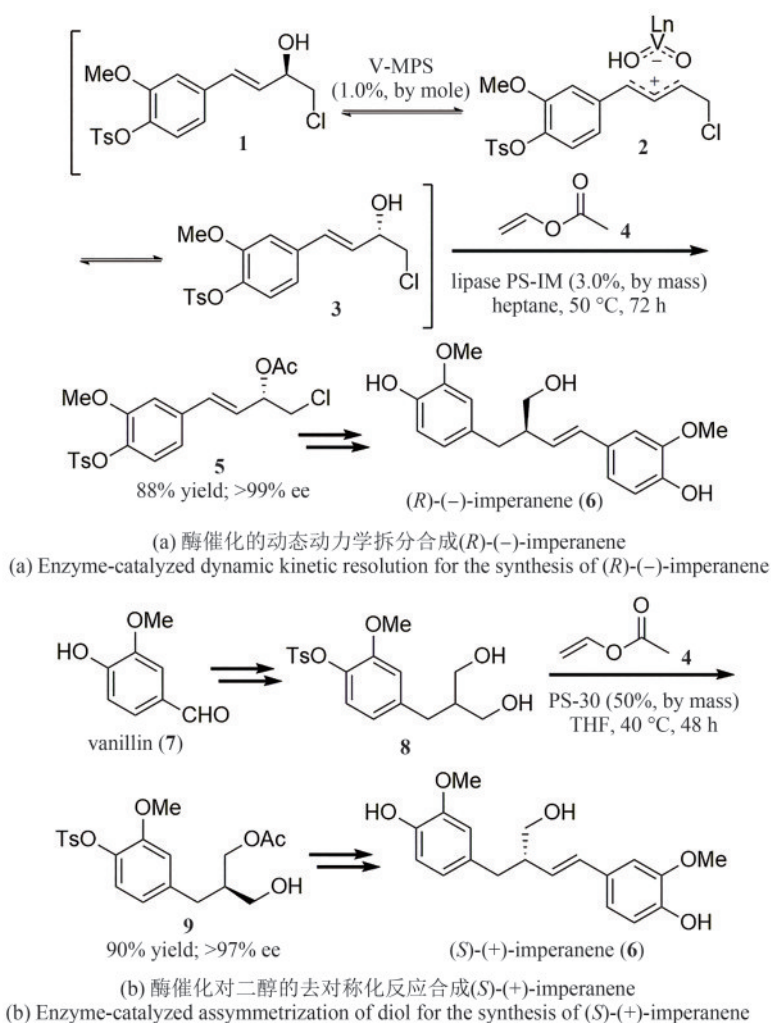


图2 酶催化反应在底物中引入关键手性中心

Fig. 2 Introduction of the key chiral center (s) to a simple substrate via enzymatic catalysis

(assymetrization, desymmetrization) 反应, 其理论产率也能达到100%。在Kirpal Bisht等<sup>[36]</sup>对6的不对称合成中就利用了对具有前手性中心的二醇底物8的去对称化反应。以香草醛(7)为起始原料, 经过5步转化即可得到所需的底物8, 在*Pseudomonas cepacia*脂肪酶(PS-30)的作用下可以90%的产率和大于97%的ee值得到单乙酰化产物9, 进一步芳环的引入即可完成6的合成[图2(b)]。

另外, 对含有前手性面的羰基、双键和芳环的对映选择性反应也是一类非常高效地引入手性中心的策略, 如甲苯双加氧酶(toluene dioxygenase)对芳环的双羟化, 和黄素依赖的单加氧酶对酚类底物的羟化反应, 都在天然产物的化学-酶法合成应用中展现了其实用性。

甲苯双加氧酶是一类Rieske非血红素铁依赖的加氧酶, 该双羟化反应最早从能对取代芳烃进行氧化降解的*Pseudomonas putida* F1菌株中发现<sup>[37-38]</sup>; 随后研究者发现其阻断突变体菌株*P. putida* 39D可以在转化甲苯(10)等芳烃时选择性累积顺-1,2-环己二醇(11)等手性产物(图3)<sup>[39]</sup>。后续对菌株中代谢基因簇的研究发现, 实现完整的芳环双羟化反应需要甲苯双加氧酶TodC1C2两个亚基, 以及氧化还原电子传递体系ferredoxin(TodB)及其还原酶(TodA), 而其最终的还原剂为NADH; 将含有以上相关基因的质粒pDTG601A转化入*E. coli* JM109中所得的工程化菌株也能完成对取代芳环的选择性双羟化转化<sup>[40]</sup>。虽然在体外构建该多酶体系也能实现对芳环的双羟化反应,

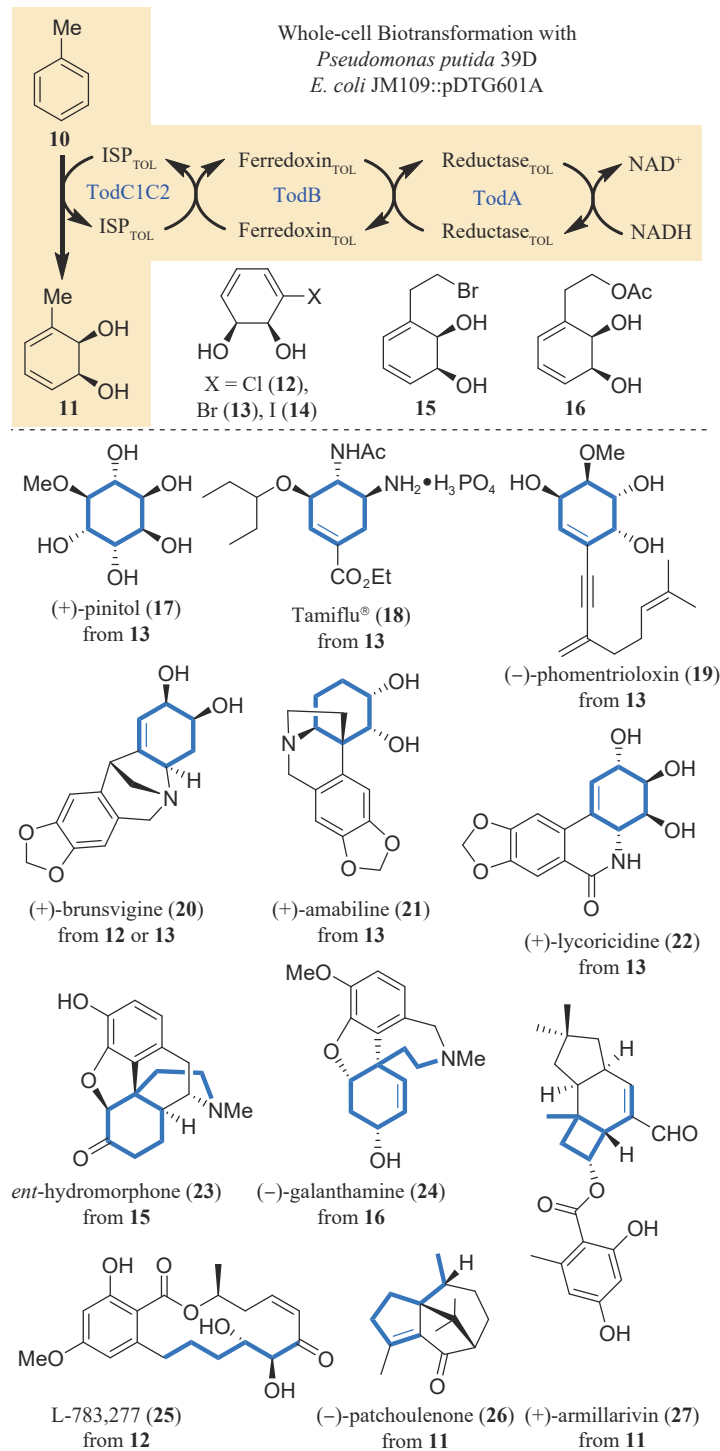


图3 甲苯双加氧酶催化的底物关键手性中心引入及其在多种天然产物合成中的应用

Fig. 3 Introduction of the key chiral center(s) to a simple substrate by the action of toluene dioxygenase and its application in the synthesis of various natural products

但从操作的经济性和反应的规模来看，利用突变菌株 *P. putida* 39D 和工程化菌株 *E. coli* JM109::pDTG601A 对取代芳烃进行全细胞生物转化是较为实用的方式。目前从相应的取代芳烃出发可以规

模化制备 12~16 等包括卤素和烷基取代的手性顺-1,2-环己二醇衍生物，所制备的衍生物可以作为重要的手性合成子进行后续不同类型天然产物的多样化合成（图3）<sup>[41-45]</sup>。如环醇类天然产物 (+)-pinitol

(17)<sup>[46]</sup>、氨基环醇类 Tamiflu<sup>®</sup> (18)<sup>[47]</sup>、植物毒素 (-)-phomentrioloxin (19)<sup>[48]</sup> 以及石蒜生物碱类 (+)-brunsvigine (20)<sup>[49]</sup>、(+)-amabiline (21)<sup>[50]</sup>、(+)-lycoricidine (22)<sup>[51]</sup>、(-)-galanthamine (加兰他敏, 24)<sup>[52]</sup> 和吗啡生物碱如 *ent*-hydromorphone (23)<sup>[53]</sup> 等的合成, 在这些合成的产物中大部分都保留了原始合成子中顺-1,2-环己二醇的结构单元。此外, 还可以对顺-1,2-环己二醇片段进行切断、Diels-Alder 环加成、重排等操作, 从而完成大环内酯 L-783, 227 (25)<sup>[54]</sup>, 以及多环萜类 (-)-patchoulone (26)<sup>[55]</sup>、(+)-armillarivine (27)<sup>[56]</sup> 等天然产物的合成, 而这些终产物中原始环己二醇合成子的结构片段已经发生了不同程度的改变, 这也为新合成策略的设计提供了更多的想象空间。

黄素依赖单加氧酶能催化酚类底物的不对称去芳构化, 这类酶目前主要从芳香聚酮的生物合成途径中发现和鉴定, 并应用于相关天然产物的合成<sup>[57]</sup>。例如在真菌聚酮 bisorbicillinoids 家族天然产物的仿生合成中, 单体 sorbicillin (29) 的氧化二聚化是其关键步骤。单体 29 可以从简单间苯二酚衍生物 28 经过 3 步转化得到, 而如何对平面结构 29 进行不对称氧化去芳构化生成 (*S*)-sorbicillinol (30) 是实现其不对称合成的难点。研究人员利用 sorbicillinol (30) 生物合成途径中的关键氧化酶 SorbC<sup>[58]</sup>, 实现了包括 bisorbicillinol (31) 和 trichodimerol (32) 等系列具有不同骨架天然产物的合成 [图 4(a)]<sup>[59]</sup>。研究发现, SorbC 可以在高达 20% 的有机溶剂存在下对 C5 位进行选择氧化生成所需的产物 30, 其 ee 值高于 99.5%。另外, 氧化生成的 30 其后续二聚化反应的选择性与酶反应时所用的助溶剂有关: 当丙酮作为助溶剂时, 酶反应体系经二氯甲烷萃取后可以自发地以 27% 的产率生成 [4+2] 环加成产物 31; 而当助溶剂为 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 时, 可以以 27% 的产率生成经 Michael 加成和缩酮化反应的产物 32, 同时还有 20% 的 31 生成。

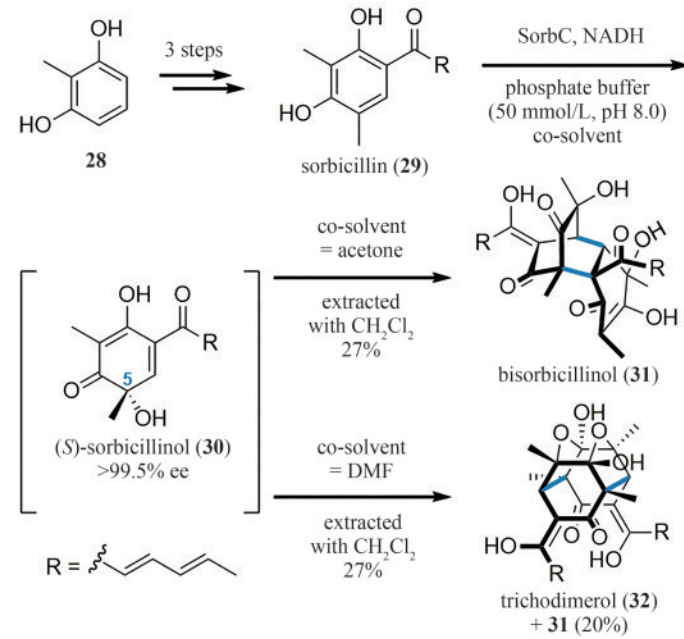
自然界中存在的具有去芳构化作用的不同黄素依赖单加氧酶, 不仅能区域选择性地芳香底物的特定位置引入羟基, 而且还能立体发散性地同一位置引入相反的手性中心 [图 4(b)]<sup>[60-63]</sup>。

如 Alison Narayan 等<sup>[64]</sup> 以已知的 TropB、AzaH、AfoD 和 SorbC 为参照, 通过对数据库中黄素依赖性单加氧酶的序列进行序列相似性网络 (sequence similarity network, SSN) 分析来挖掘具有特定功能的黄素依赖单加氧酶。研究发现, 从不同 azaphilone 类天然产物生物合成途径中鉴定的氧化酶均能对取代间苯二酚衍生物 33 进行区域选择性的 C7 位羟化, AzaH 能立体选择性地生成 (7*R*)-34, 而 AfoD 能生成其对映异构体 (7*S*)-34。中间体 34 可以与从 35 原位生成的酰基烯酮进行酰化反应和 Knoevenagel 缩合, 分别生成 trichoflectin 的两个对映异构体 (*R*)-(-)-36 和 (*S*)-(+)-36, 并将天然产物的结构修正为 (*R*)-(-)-trichoflectin。利用酶催化的不对称去芳构化反应, 该团队还完成了 (*S*)-deflectin 1a 和 lunatoic acid A 的全合成。尽管以上酶催化反应仅利用其直接底物或类似底物, 但这为天然产物合成中关键手性中心的引入提供了高效的方法, 从而大大缩短了合成的路线。

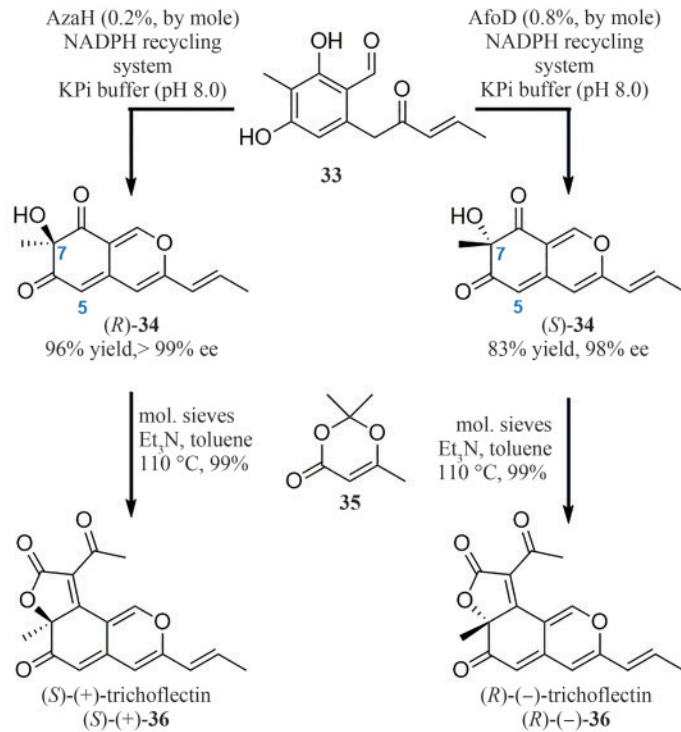
## 1.2 酶催化反应引入底物的关键官能团

尽管目前有丰富多样的商业可得合成前体可供选择, 但是鉴于天然产物的特殊结构片段和修饰类型, 合成过程中往往需要对合成前体的特定位置进行官能团化, 而在此过程中引入酶催化反应往往能避免常规化学合成中冗余的操作 (如保护基), 从而提高合成的效率。

例如非核糖体肽类天然产物中往往存在着多样的非天然氨基酸的砌块, 其生物合成中涉及多种修饰酶对天然氨基酸的官能团化, 这其中  $\alpha$ -酮戊二酸依赖的非血红素铁加氧酶 ( $\alpha$ -ketoglutarate-dependent non-heme iron oxygenase) 是一类可以在非活化的  $sp^3$  杂化碳上进行氧化的酶<sup>[65]</sup>。利用酶反应高效构建多样非天然氨基酸砌块单元不仅能够很好地与汇聚式全合成策略兼容, 同时还可以快速制备多样化的肽类衍生物用于构效关系研究<sup>[66]</sup>。利用 Anne Zapparucha 等通过基因组挖掘而发现的具有在 L-赖氨酸的 3 位进行羟化功能的  $\alpha$ -酮戊二酸依赖加氧酶 KDO1<sup>[67]</sup>, Hans Renata 等<sup>[68]</sup> 从 L-赖氨酸 (37) 出发, 能以克级规模一步制备 3-羟基-L-赖氨酸 (38), 并通过后续 4 步的化学转化制备了



(a) SorbC对芳环C5的羟化在bisorbicillinol和trichodimerol合成中的应用  
(a) Hydroxylation of C5 of aromatic ring by SorbC and its application in the synthesis of bisorbicillinol and trichodimerol



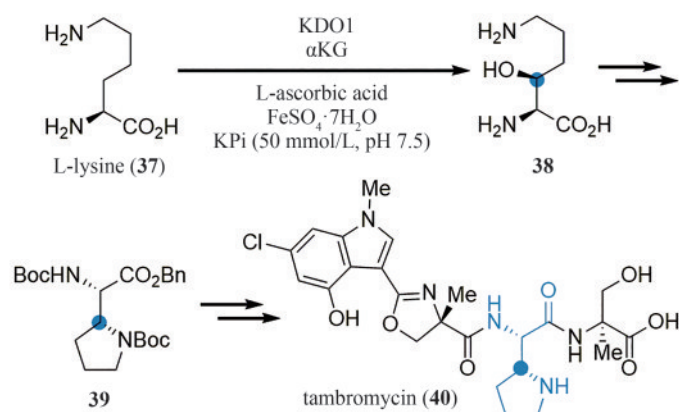
(b) AzaH和AfoD对芳环C7位的立体选择性羟化及其在trichoflectin合成中的应用  
(b) Stereoselective hydroxylation of C7 of aromatic ring by AzaH and AfoD and its application in the synthesis of trichoflectin

图4 黄素依赖单加氧酶催化的酚类底物关键手性中心引入

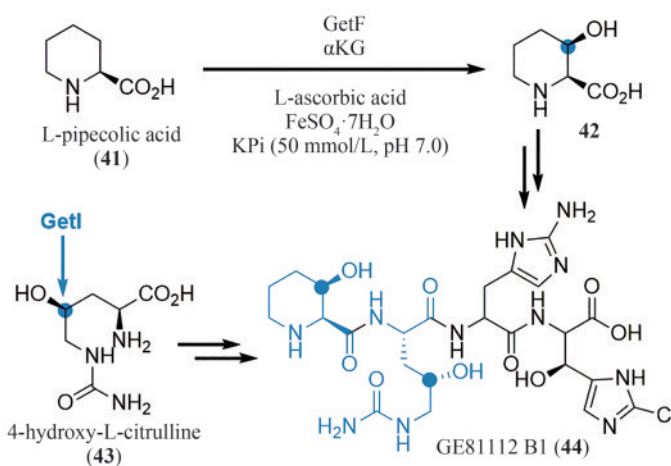
Fig. 4 Introduction of the key chiral center(s) to a phenolic substrate by the action of flavin-dependent monooxygenases

具四氢吡咯结构非天然氨基酸 tambroline 的衍生物  
39, 完成了非核糖体肽类天然产物 tambromycin

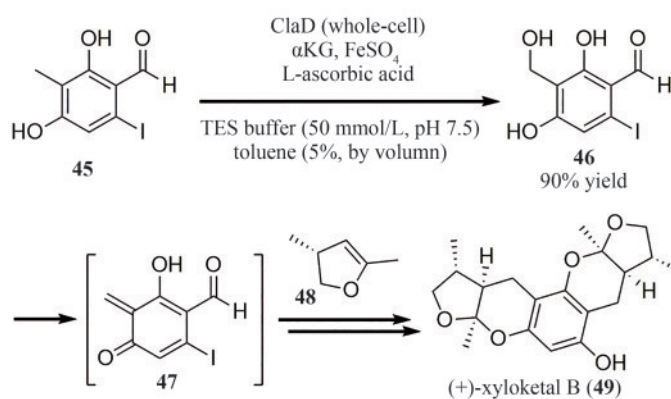
(40) 的汇聚式合成 [图5(a)]。类似地, 利用在  
GE81112生物合成途径中鉴定的两个 $\alpha$ -酮戊二酸依



(a) KDO1对L-赖氨酸的选择性羟化及其在tambromycin合成中的应用  
(a) Selective hydroxylation of L-lysine by KDO1 and its application in the synthesis of tambromycin



(b) GetF对L-哌啶甲酸和GetI对L-瓜氨酸的选择性羟化及其在GE81112 B1合成中的应用  
(b) Selective hydroxylation of L-pipecolic acid and L-citrulline by GetF and GetI, respectively, and their application in the synthesis of GE81112 B1



(c) ClaD对苄基甲基的羟化及其在(+)-xyloketal B合成中的应用  
(c) Hydroxylation of the benzylic methyl group by ClaD and its application in the synthesis of (+)-xyloketal B

图5  $\alpha$ -酮戊二酸依赖的非血红素铁双加氧酶催化的底物关键官能团引入

Fig. 5 Introduction of the key functional group(s) to the substrate via  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent non-heme iron dioxygenase

赖加氧酶 GetF<sup>[69]</sup> 和 GetI<sup>[70]</sup>, Hans Renata 等<sup>[71]</sup> 分别对 L-哌啶甲酸 (L-pipecolic acid, **41**) 的 3 位和 L-瓜氨酸 (L-citrulline) 的 4 位进行选择性地羟化制备相应的非天然氨基酸砌块 **42** 和 **43**, 以最长线性步骤 11 步完成了环肽 GE81112 B1 (**44**) 的全合成 [图 5(b)]。

除了氨基酸,  $\alpha$ -酮戊二酸依赖的双加氧酶还可以接受不同种类的底物进行反应。如 Alison Narayan 等利用从 penilactone 类天然产物生物合成途径中鉴定的 ClaD, 成功在间苯二酚类底物如 **45** 的苯位进行羟基化<sup>[72-73]</sup>, 得到的 **46** 可原位生成邻亚甲基苯醌 **47**, 该活性中间体可与富电子亲双烯体 **48** 进行逆电子需求的氧杂 Diels-Alder 反应, 后续将醛基还原为羟基之后再继续进行第二次逆电子需求的 Diels-Alder 反应, 从而完成了 (-)-xyloketal B (**49**) 的不对称合成 [图 5(c)]<sup>[74]</sup>。

### 1.3 多取代芳(杂)环骨架前体的制备

一些芳香聚酮类以及生物碱类天然产物中经常含有复杂的多取代芳香(杂)环片段, 目前过渡金属催化的交叉偶联方法学的发展为多取代芳环的制备提供了高效的方法; 另外, 借用天然产物的生物合成途径, 以体内或体外的方式制备多取代芳香(杂)环生物合成中间体也可以用于后续天然产物的合成。利用酶催化的方式制备多取代芳香(杂)环主要依赖天然产物生物合成途径相关酶的应用, 而对天然产物类似物的多样化合成需要更多样的取代基和不同取代方式的芳香(杂)环作为起始原料, 这需要相关酶底物杂泛性的进一步拓展以及其催化效率的进一步提高。

Yoshiteru Oshima 等<sup>[75-76]</sup> 将来自 *Chaetomium indicum* 编码 chaetophenol 类天然产物芳香骨架生物合成的非还原性聚酮合酶 (non-reducing polyketide synthase, NR-PKS) *pksCH-2* 基因导入到宿主米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中进行异源表达, 发酵过程中首先产生 NR-PKS 的原始产物六取代的间苯二酚衍生物 **50**, 随后在异源宿主的作用下转化为异色满 (isochromene) 衍生物 **51**, 其收率超过了 30 mg/L。异色满衍生物 **51** 可以在一定的条件下 (酸, 碱, 氧化), 通过原位生成的活性邻亚甲基苯醌中间体

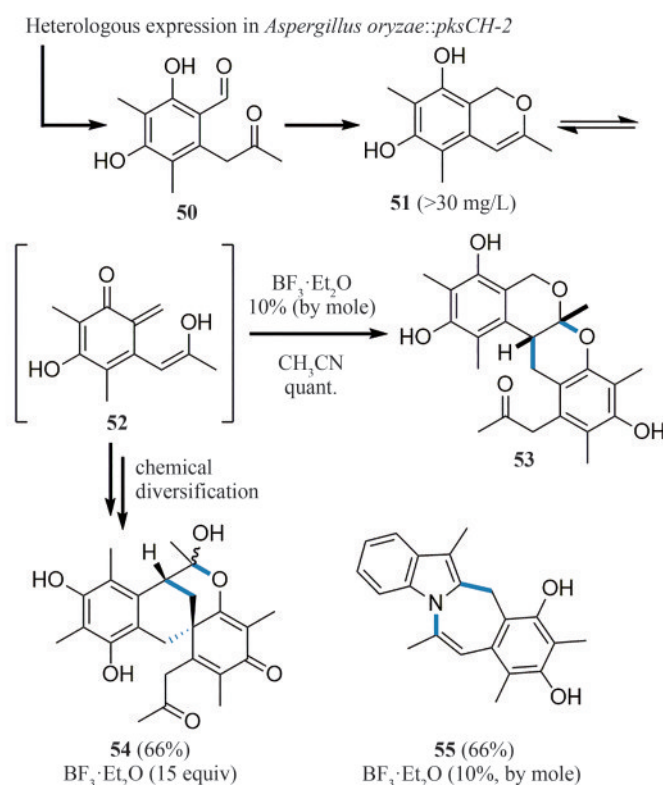
**52** 进行寡聚或杂合反应, 从而作为一个多功能中间体进行多样化合成, 制备如 **53~55** 等多种含有天然产物骨架和非天然产物骨架的衍生物, 从而扩展了这一类天然产物的化学空间 [图 6(a)]。

在生物碱合成方面, 如源于色氨酸二聚的 spiroindimicin 家族天然产物, 除了具有特殊的 [5,6] 螺环和 [5,5] 螺环骨架之外, 还存在四取代的吡咯片段<sup>[77]</sup>。前期对该家族天然产物的合成主要集中于吡咯骨架的合成<sup>[78]</sup>, 或在已有的吡咯骨架上进行选择性偶联<sup>[79]</sup>, 从而构筑二聚色氨酸骨架。徐正仁等<sup>[80]</sup> 利用二聚色氨酸天然产物生物合成途径中的两个色氨酸二聚的关键酶, 包括色氨酸氧化酶 LaStaO 和 chromopyrrolic acid 合成酶 VioB, 发展了从 L-色氨酸 (**56**) 出发, 通过体外双酶催化一锅制备 chromopyrrolic acid 的合成体系, 产物经甲酯化后即可以 69% 的产率得到 lycogarubin C (**57**)。基于保护的 lycogarubin C, 通过选择性地分子内 C3'-C4'' 和 C3'-C2'' 氧化偶联, 在 6 步以内分别完成了具有 [5,6] 螺环骨架的 spiroindimicin H (**58**) 和具有 [5,5] 螺环骨架的 spiroindimicin G (**59**) 的合成 [图 6(b)]。

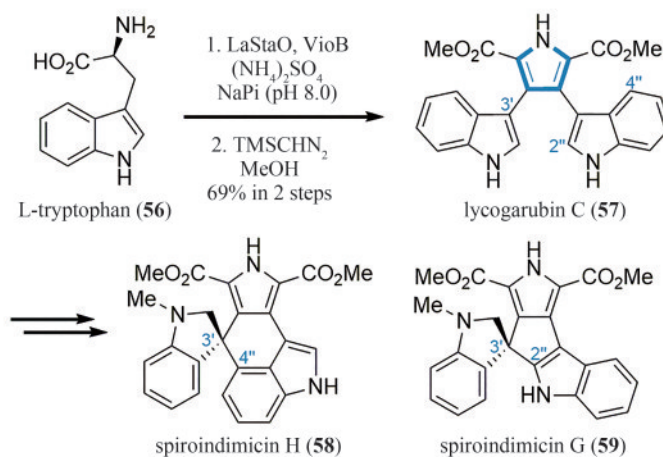
### 1.4 具有复杂骨架的手性前体制备

手性池策略的引入可以充分利用合成前体中存在的复杂结构和手性中心, 从而简化天然产物的合成。不过由于常用的手性池原料种类相对有限, 利用合成生物技术提供更广泛的手性池原料, 这为天然产物合成策略的设计和 method 的应用提供了更灵活的空间。这其中萜类骨架的制备是目前研究较多的一类。

萜类天然产物在生物体内由包括焦磷酸异戊烯酸酯 (**65**, IPP) 和焦磷酸二甲基烯丙酯 (**66**, DMAPP) 两个生源异戊二烯五碳单元组装而来<sup>[81]</sup>。目前发现生物体内主要有两条途径来合成 IPP 和 DMAPP, 即起始于乙酰辅酶 A (**60**) 的甲羟戊酸途径 (MVA pathway) 和起始于丙酮酸 (**61**) 和 D-3-磷酸甘油醛 (**62**) 的 2-甲基赤藓醇磷酸途径 (MEP pathway)。另外, 近年来发展了一条人工的异戊烯醇利用途径 (isopentenol utilization pathway), 可以通过激酶对异戊烯醇 (**63**, prenol)



(a) 六取代间苯二酚的异源合成及其在异色满衍生物中的合成应用  
(a) Heterologous production of hexa-substituted resorcinol and its application in the synthesis of iso-chromene derivatives



(b) 酶催化的色氨酸二聚化制备四取代吡咯及其在spiroindimicin家族天然产物合成中的应用  
(b) Enzyme-catalyzed dimerization of tryptophan for the preparation of tetra-substituted pyrrole and its application in the synthesis of spiroindimicin family of natural products

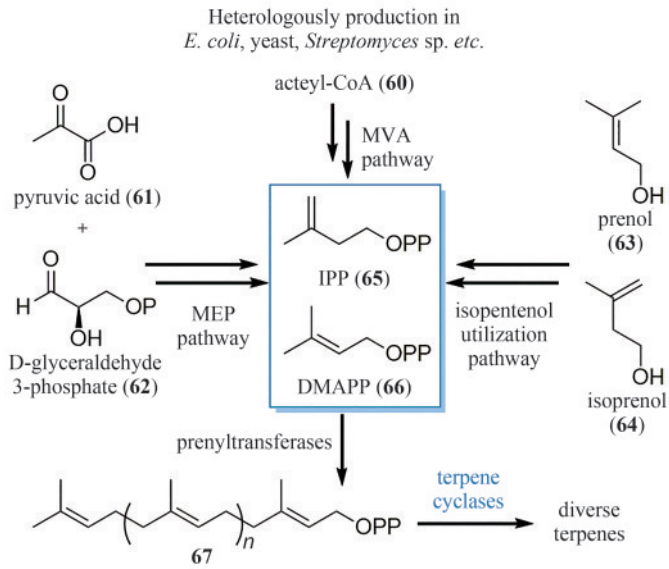
图6 多取代芳香类骨架前体的酶法制备

Fig. 6 Enzymatic preparation of substrates with multiple-site substituted aromatic skeletons

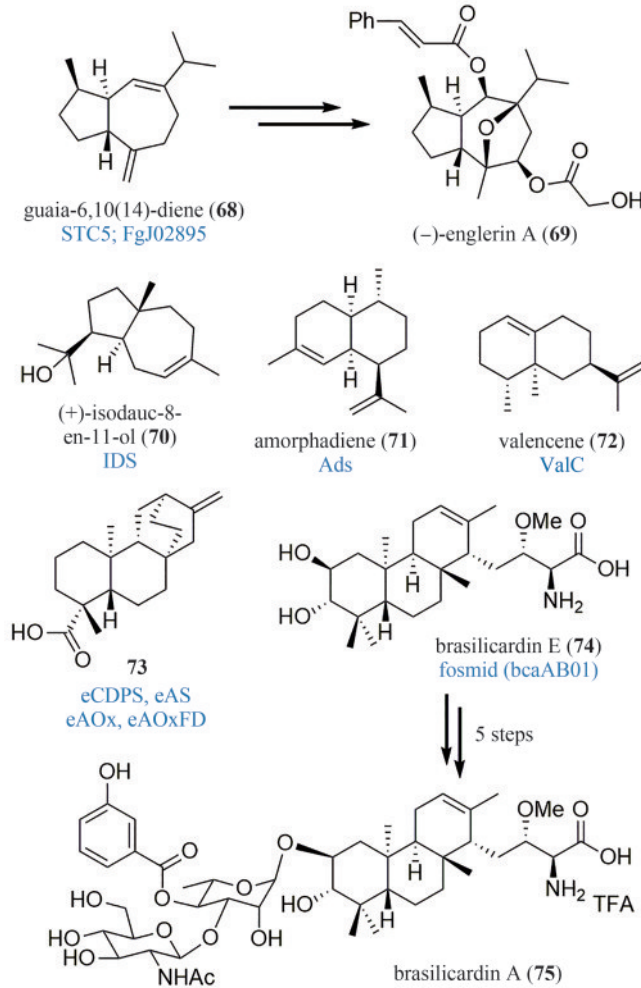
和3-甲基-3-丁烯-1-醇 (**64**, isoprenol) 进行两步的磷酸化制备DMAPP和IPP。后续通过异戊烯基转移酶的作用对五碳单元进行延伸生成寡聚的线性环化前体**67**，在不同的萜环化酶作用下，即可生成多样的萜类骨架。依据以上萜类生物合成的

基本逻辑，在大肠杆菌、酵母、放线菌等不同的异源宿主中对萜类骨架进行异源制备成为拓展萜类手性池原料的有效方式，并且成功应用于多样萜类天然产物的合成 [图7(a)]。

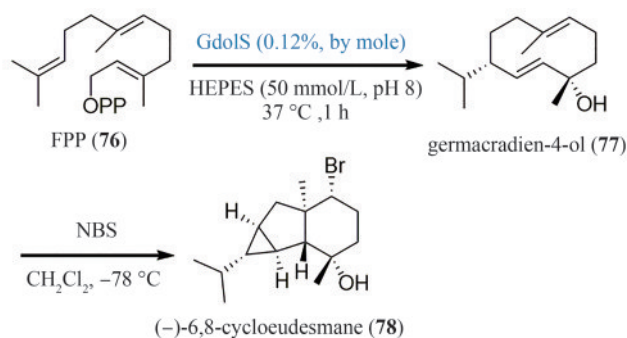
如刘天罡和Mathias Christmann等<sup>[82]</sup>通过工程



(a) 萜类生物合成的MVA途径和MEP途径以及人工异戊烯醇利用途径  
(a) MVA, MEP and artificial isopentenol utilization pathways for the biosynthesis of terpenes



(b) 异源表达制备萜类骨架前体及其在萜类天然产物合成中的应用  
(b) Heterologous production of terpene skeletons and their applications in the synthesis of terpene natural products



(c) 体外酶催化制备萜类骨架及其在天然产物合成中的应用  
(c) *In vitro* enzyme-catalyzed preparation of terpene skeleton and its application in the synthesis of terpene natural products

图7 萜类前体的制备

Fig. 7 Preparation of terpenoid precursors

化的大肠杆菌和酿酒酵母，利用从真菌中挖掘得到的愈创木烷型倍半萜环化酶FgJ02895，制备了guaia-6,10(14)-diene (68)。由于已经具备了目标产物的基本骨架，从68出发仅通过氧化态调整和酯化反应等化学转化即完成了包括TRPC通道激动剂(-)-englerin A (69)等在内的三个天然产物的合成。几乎同时，项征等<sup>[83]</sup>报道了利用已知萜环化酶STC5在工程化大肠杆菌中制备68，并以相同的两相式合成策略完成了(-)-englerin A等四个天然产物的合成。另外，通过利用萜环化酶IDS以及代谢工程的优化，项征等<sup>[84]</sup>还能以超过1 g/L的产率制备萝卜烷型倍半萜(+)-isodauc-8-en-11-ol (70)，后续分别通过2步和5步化学转化完成了(+)-schisanwilsonene A和(+)-tormesol的合成[图7(b)]。与原先报道的化学全合成相比，之前对(-)-englerin A和(+)-schisanwilsonene A的合成更关注如何利用新策略和方法来高效合成复杂的萜烯骨架<sup>[85-87]</sup>，而现在萜环化酶的引入解决了骨架的制备，从而使后续合成的关注点转移到氧化态调整和修饰基团引入等方面。

除了将天然的MVA和MEP途径引入异源宿主细胞外，异戊烯醇利用途径也是近年来开发的一条为异源宿主高效提供萜生物合成前体的途径。如Zhou Kang和Wu Jie等<sup>[88]</sup>利用该途径在工程化的大肠杆菌中制备了amorphadiene (71)和valencene (72)两种类型的倍半萜类骨架，并进一步开发了可见光介导的烯丙位选择性氧化等方法学对萜烯进行选择性官能团化，从而合成了包括诺卡酮在内的多个天然产物及其类似物。

萜环化酶的产物往往缺少关键位点的氧化态修饰，因此在异源宿主中再导入相应的氧化酶来制备具有特定氧化态的萜类前体也成为高效制备萜类天然产物的实用策略。例如Michael Smanski等<sup>[89]</sup>在异源链霉菌宿主中除了引入编码合成ent-atrisane二萜骨架的对映柯巴基焦磷酸合成酶(eCDPS)和ent-atiserene合成酶(eAS)基因之外，还引入了编码相应的氧化酶eAOx及其氧化还原电子传递体系eAOxFD的基因，同时通过代谢途径的优化，成功制备了19位氧化为羧酸的ent-atiserenoic acid (73)；随后通过4步化学转化即完成了具有神经保护活性的天然产物serofendic acid的合成。类似地，Harald Gross等<sup>[90]</sup>利用fosmid文库克隆了编码brasilicardins类天然产物生物合成的基因簇，并将其转入灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中，通过培养基优化、调控基因过表达、萜前体供应途径增强等方面的优化，能以接近克级每升的产量得到具有产物最终氧化态的brasilicardin E (74)。从74出发，再通过5步化学转化，即可完成具有免疫抑制活性的天然产物brasilicardin A (75)的合成，通过以上方式所制备的75足以支撑其临床前研究。

相较于异源宿主的体内转化，体外酶催化反应尽管其制备规模常常受底物的制备和酶的生产限制，但由于反应条件容易控制，且背景更干净，因此也可用于萜类骨架的快速制备。如Nuno Maulide等利用从链霉菌*Streptomyces citricolor*中挖掘得到的germacradien-4-ol (77)合成酶GdoIS作为生物催化剂<sup>[91]</sup>，从环化前体焦磷酸法尼酯

(**76**, FPP) 出发以克级的规模制备 **77**。随后, 该团队利用低温 NBS 诱导的仿生碳正离子环丙烷化过程, 仅用一步就从十元环底物转化为具有 3-5-6 并环系统的天然产物(-)-6,8-cycloeudesmane (**78**) [图 7(c)]<sup>[92]</sup>。这里需要指出的是, 由于市售的 **76** 价格昂贵, 在实验室里从廉价的法尼醇通过化学转化制备 **76** 成为规模化体外制备的首选。

## 2 合成后期阶段酶催化反应的应用

天然产物多样性的特点除了体现在其骨架本身的变化之外, 在骨架结构的不同位置进行诸如羟化、卤化、酰基化、糖基化等不同性质的修饰也是体现其多样性的重要方面。从合成策略上来说, 这些骨架上的修饰基团一方面可以在合成前期将相应的官能团以适当的形式在原料中引入, 尽管原先的合成策略和路线大部分均能适用, 但不同的修饰产物都需要从头进行合成, 因而从多样性合成的角度看其效率不高; 另一方面也可以在合成后期进行修饰, 在骨架形成之后再引入官能团, 该策略从同一个复杂中间体出发, 可以实现天然产物的快速多样化合, 同时还能制备各种不同的衍生物, 因而成为天然产物多样化合以及药物化学研究的理想策略之一<sup>[93-94]</sup>。不过由于天然产物本身结构的复杂性, 合成后期的修饰需要发展具备多官能团兼容性、高选择性以及对惰性位置的选择性活化等特点的合成方法学, 而酶催化反应所提供的温和条件和高选择性能很好地满足这些需求。在目前的合成实践中, 通过筛选具有宽泛底物谱的已知酶(如细胞色素 P450<sub>BM3</sub>)及其突变体库, 或者通过生物合成途径或生物转化信息从相应的生物体中发现修饰酶, 是目前快速确认能对特定底物进行选择性修饰的两种重要方式。

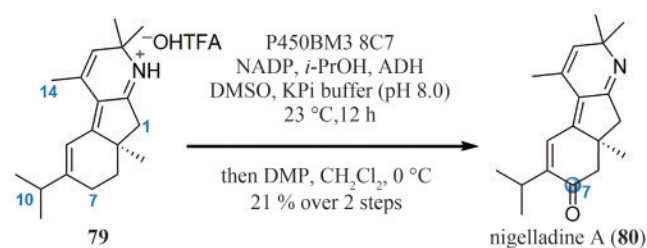
### 2.1 基于具有宽泛底物谱已知酶的筛选和改造

当一个被广泛研究的酶能接受不同类型的底物进行反应时, 该酶及其突变体可以成为一个理想的生物催化剂筛选平台, 用于开发具有特定催化能力的后修饰工具酶。细胞色素 P450 单加氧酶

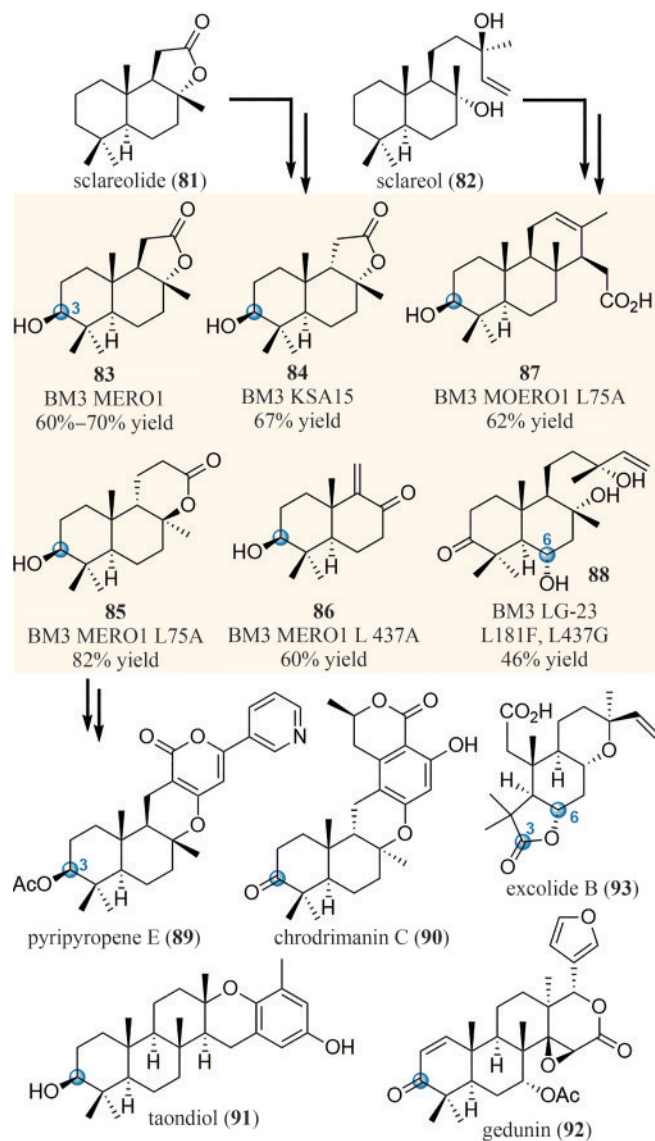
是催化复杂底物进行选择性官能团化的一类重要工具酶, 对惰性碳氢键进行选择性氧化的能力使其成为复杂底物后修饰氧化官能团化的首选<sup>[95-96]</sup>, 特别是从巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中发现的 P450<sub>BM3</sub>, 能对多种类型的底物进行氧化<sup>[97]</sup>。因此通过对 P450<sub>BM3</sub> 突变体库进行筛选, 并进一步通过定向进化进行改造, 可以与合成化学方法进行互补, 为天然产物多样化合合成的后期修饰提供实用的工具。

Brian Stoltz 和 Frances Arnold 课题组<sup>[98]</sup>在 2017 年合作报道了降二萜生物碱 nigelladine A (**80**) 的首次不对称化学-酶法全合成 [图 8(a)]。在他们的合成中, 当构筑了关键的 6-5-6 三环并环骨架 **79** 之后, 如何在合成后期在四个可能的烯丙位 (C1, C7, C10, C14) 中实现选择性 C7 位氧化, 成为合成的关键。在进行了大量的化学氧化条件筛选之后, 他们发现大部分烯丙位氧化条件主要在 C1 位或 C10 位进行氧化; 虽然在部分金属盐(如铈、铬)等介导的烯丙位氧化条件下能检测到微量的 C7 位氧化产物, 但反应的选择性差, 同时还伴随着很多过度氧化的产物。随后他们转向酶催化的方式进行 C7 位氧化, 利用前期研究所积累的能接受大体积底物的 P450<sub>BM3</sub> 突变体集中库 (focused library) 进行酶活性筛选, 结合筛选的结果进一步进行部分位点的改造, 发现突变体 8C7 能以 2.8:1 的区域选择性在 C7 位进行羟化, 再经 Dess-Martin 氧化后, 即可以两步 21% 的产率, 完成 nigelladine A (**80**) 的全合成。

另外, 这里所提及的合成后期阶段并非完全从合成的步骤出发, 对于整体或部分母核骨架形成后进行的酶催化修饰也在此部分介绍。如 Hans Renata 等<sup>[99-102]</sup>利用市售大量可得的香紫苏内酯 (**81**, sclareolide) 和香紫苏醇 (**82**, sclareol) 所具备的反式十氢化萘补身烷 (drimane) 骨架, 同时利用报道的对类似萜类骨架具有羟化活性的 P450<sub>BM3</sub> 突变体, 结合原先构建的小规模突变体库以及定向进化技术, 以 **81**、**82** 及其系列衍生物为底物进行了筛选 [图 8(b)]。结果发现不同的 P450<sub>BM3</sub> 突变体可以实现对 **81** 及其衍生物 C3 位的羟化制备 **83**~**86**, 也可以实现对 **82** 及其衍生物的选择性 C3 和 C6 位羟化制备 **87**~**88**, 而且部分羟化产



(a) P450BM3突变体在nigelladine A全合成中的后期选择性羟化  
(a) Stereoselective late-stage hydroxylation in the synthesis of nigelladine A by P450BM3 mutant



(b) P450BM3突变体的后期选择性羟化在萜类天然产物合成中的应用  
(b) Selective late-stage hydroxylation by P450BM3 mutants and their applications in the synthesis of terpene natural products

图8 基于细胞色素P450<sub>BM3</sub>突变体库筛选和改造的天然产物合成

Fig. 8 Natural product synthesis based on screening of cytochrome P450<sub>BM3</sub> mutants and its engineering

物如 **83**、**86** 和 **87** 还可以实现克级规模的酶催化制备，这使得合成设计时规避了对相应骨架片段的

从头合成，从而缩短了合成的步骤。以此酶催化反应对惰性碳氢键的选择性氧化为基础，通过后

续简单的化学转化完成了如 pyripyropene E (**89**)、chrodriamanin C (**90**) 和 taondiol (**91**) 在内的多个杂萜类天然产物, 柠檬苦素类天然产物 gedunin (**92**) 以及二萜 excolide B (**93**) 等的合成。这里需要指出的是, 目前酶催化的反应主要用于在比较惰性的位置引入相应的氧化态, 可以看到所合成的大部分的天然产物如 **89**~**92** 基本完整地保留了酶催化所得到的 3-羟基-补身烷产物的结构片段。不过也可以看到在部分天然产物的合成中, 利用酶催化反应策略性地在特定位置引入氧化态后再进行骨架转化的尝试。如在 excolide B (**93**) 的合成中, 其中间体 **88** 中 C3 位氧化态的引入是为了进行后续 C2—C3 碳碳键的断裂, 从而完成 A 环的裂环<sup>[102]</sup>。

## 2.2 基于生物合成/转化途径中修饰酶的发现与改造

在天然产物生物合成途径中, 酶催化的反应往往具有一定的底物杂泛性; 特别是对结构相似的底物, 也往往表现出相同或相似的选择性。因此可以通过已解析的天然产物生物合成途径, 通过底物结构和反应功能的类比来筛选特定的酶用于对所需底物的修饰, 这样可以提高寻找具有所需反应活性的酶的成功率。类似地, 菌株中蕴含着巨大的生物催化转化的潜力, 而菌株对特定底物的生物转化能力预示着该菌株编码了能催化特定反应进行的酶。因此, 从具有转化相同或相似底物能力的菌株出发寻找相应的酶, 也是提高发现具有特定功能酶的一条有效途径。

沈奔和 Hans Renata 课题组利用前期在研究平板霉素和平板素生物合成途径中发现的对映-贝壳杉烷 (*ent*-kaurane) 骨架 C7 位具有羟化活性的  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG) 依赖的双加氧酶 PtmO6<sup>[103]</sup>, 以及对 C11 位具有羟化活性的细胞色素 P450 单加氧酶 PtmO5<sup>[104]</sup>, 结合对细胞色素 P450<sub>BM3</sub> 突变体的改造和筛选所得到的对 C2 位具有羟化活性的 BM3 MERO1 M177A 突变体, 在 2020 年合作报道了对系列源于对映-贝壳杉烷骨架的二萜的化学-酶法合成<sup>[105]</sup>。他们以源于甜菊苷的甜菊醇 (**94**, steviol) 或对映-贝壳杉烯酸 (*ent*-kaurenoic acid) 为原料, 通过以上三种高选择性工具酶的组合使

用, 再辅以一定的导向碳氢活化反应和氧化态调整措施, 从而在 10 步以内完成了 6 个对映-贝壳杉烷类二萜的合成。如从甜菊醇 (**94**) 出发 [图 9(a)], 利用 PtmO6 可以在 C7 位进行选择性羟化, 再经 PDC 的氧化即可得到 7-羰基衍生物 **95**; 随后再利用 PtmO5 对 C11 位进行羟化, 可以 67% 的产率得到 **96**。在经过羟基乙酰化和羧基还原得到 **97** 之后, 进一步的烯丙位氧化和羟基的酰化即可完成天然产物 rosthornins C (**98**) 和 rosthornins B (**99**) 的合成。这里值得说明的是, 作者将来源于 P450<sub>Rhf</sub> 的还原伴侣结构域融合到了 PtmO5 蛋白的碳端, 构建了 PtmO5-RhFRed, 从而提高了 I 型 P450 酶 PtmO5 的催化效率和操作的简便性。另外, 酶催化反应除了在惰性的位置引入所需的氧化态保留至最终产物之外, 策略性地氧化态引入也可以成为后续骨架重排的驱动力。如从具有对映-贝叶烷 (*ent*-beyerane) 骨架的异甜菊苷 (**100**) 出发 [图 9(b)], 利用 PtmO5 可以在 C12 位进行高效的羟化, 能以 92% 的收率得到 **101**。通过酶催化装配的 12-羟基能在酸性条件下作为促进 Wagner-Meerwein 重排的引发点, 生成具有对映-阿替生 (*ent*-atisane) 骨架的 **102**, 而 **102** 还可进一步重排成 *ent*-trachylobane 骨架。组合三种工具酶对 *ent*-atisane 和 *ent*-trachylobane 骨架进行修饰也可以完成多种天然产物的合成<sup>[105]</sup>。

甾体化合物的 C14 位修饰与其生物活性密切相关, 而目前尚未报道其生物合成过程中负责 14 $\beta$ -羟基修饰的酶。2022 年, 戈惠明课题组<sup>[106]</sup>通过对生物体不同组织的转录组差异分析, 从夹竹桃科植物牛角瓜 (*Calotropis gigantea*) 和中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 成功鉴定了具有在甾体母核的 C14 位进行羟化功能的两个细胞色素 P450 单加氧酶 CgCYP11411 和 BgCYP44476。如图 10(a) 所示, 表达 CgCYP11411 或 BgCYP44476 的酵母均能将雄烯二酮 (**103**, androstenedione) 转化为 14 $\alpha$ -羟基修饰的衍生物 **104**。为了进一步提高该反应的效率和选择性, 作者通过菌株筛选和条件优化, 发现真菌 *Curvularia lunata* CGMCC 3.9012 能以 70% 的收率将 **103** 转化为 **104**。**104** 经过还原、保护等操作, 可得到将 14 $\alpha$ -羟基消除为  $\Delta^{14}$ -烯炔的中间体 **105**; 再经过 Mn(acac)<sub>2</sub> 催化的 Mukaiyama 水合反应, 可以立体选择性地得到具有 14 $\beta$ -羟基的中

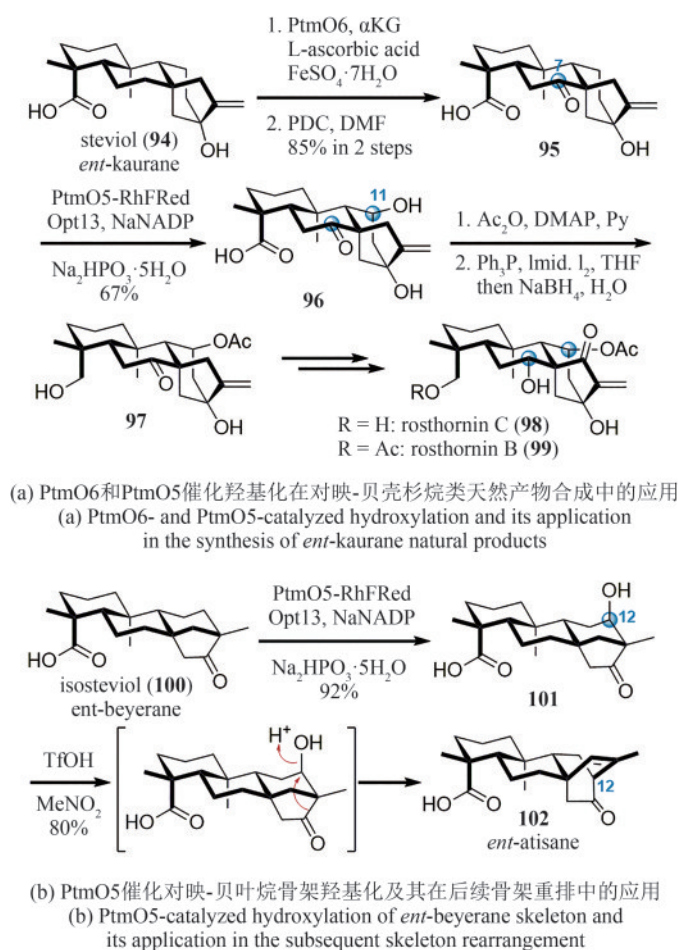


图9 基于生物合成途径修饰酶应用的天然产物合成

Fig. 9 Natural product synthesis based on enzymes from biosynthetic pathways

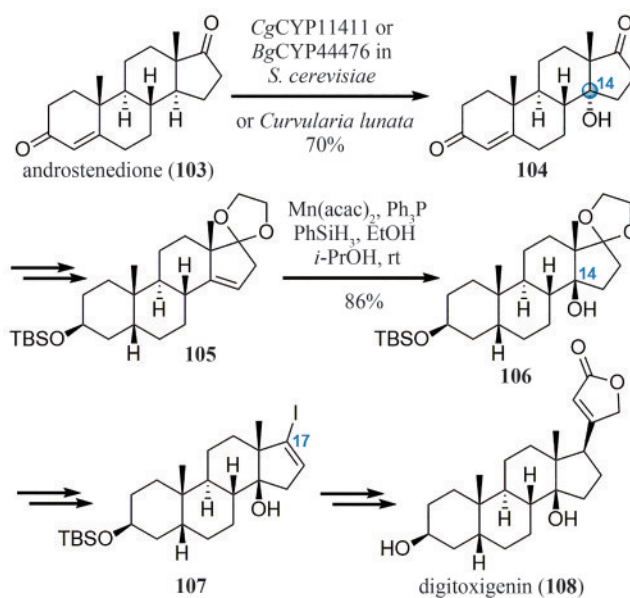
间体 **106**。强心甙 (cardenolides) 和蟾酥甙 (bufadienolides) 中 C17 位的五元和六元内酯取代基由烯基碘中间体 **107** 经 Stille 偶联引入, 从而完成如 digitoxigenin (**108**) 等甙体的合成。

类似地, 周强辉和瞿旭东课题组<sup>[107]</sup> 合作在 2023 年报道从 *Curvularia lunata* CGMCC 3.3589 中发现了具备甙体 C14 $\alpha$  羟化功能的细胞色素 P450 单加氧酶 C1CYP14A, 同时通过蛋白结构预测、丙氨酸扫描、迭代饱和突变等技术对该蛋白进行了改造, 得到了 C14 $\alpha$  羟化效率和区域选择性大幅提高的两个突变体 C1CYP14A I111L/M115K 和 C1CYP14A I111L/V124W。表达这两个突变体的酵母能成功地将 C17 位具有侧链的甙体, 如脱氧皮质酮 (**109**, deoxycorticosterone) 以 68% 的产率转化为 **110** [图 10(b)]。后续通过类似的脱水-水合策略引入 14 $\beta$ -羟基, 再经过 8 步转化完成强心苷类天

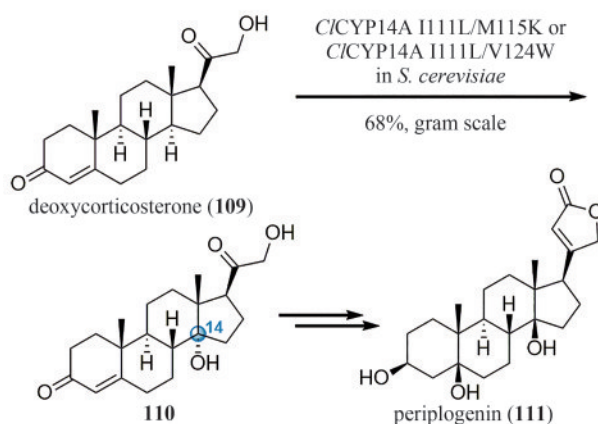
然产物 periplogenin (**111**) 的合成。

### 3 酶催化反应在骨架合成中关键碳碳键形成上的应用

在天然产物合成中, 复杂环系的构建以及在这一过程中所涉及的关键碳碳键形成往往是合成设计的关键, 需要化学家发挥想象力, 根据化学成键的基本规律来开发新的合成方法, 设计新的合成策略。随着对生物催化工具酶的开发以及对天然产物生物合成途径的解析, 目前可用于合成应用的工具酶的种类和数量在近几年有了爆炸性的增长, 为天然产物的化学-酶法合成提供了丰富的工具。不过酶催化反应由于受到本身底物特异性和反应选择性的限制, 其应用在合成策略的



(a) 基于生物合成途径中羟化酶的挖掘在甾体合成中的应用  
(a) Hydroxylases mining from biosynthetic pathway and its application in the synthesis of steroids



(b) 基于生物转化信息的羟化酶挖掘及其在甾体合成中的应用  
(b) Hydroxylases mining based on the biotransformation information and its application in the synthesis of steroids

图10 基于生物合成/生物转化途径修饰酶应用的天然产物合成

Fig. 10 Natural product synthesis based on enzymes from the pathways in biosynthesis or biotransformation

设计逻辑上大部分是单向的，即基于已知的酶催化反应信息进行合成设计的方式比较常见，而基于逆合成分析去寻找、设计、改造新功能的酶用于天然产物合成的关键步骤，在目前的技术条件下需要消耗大量的资源，而且其最终的结果也是不确定的。因此从目前的合成实践来看，酶催化反应在关键骨架合成方面的应用更多的是对生物合成途径的验证，以及对关键酶底物杂泛性的拓展。

环加成反应是成键效率较高的一类反应，能

在形成复杂环系的同时构筑多个手性中心，因此成为具有复杂环系天然产物的合成设计时很受欢迎的合成策略。在天然产物生物合成途径中所发现的能催化周环反应的酶<sup>[108]</sup>，不光能显著地提高反应的速率，而且还能有效地控制反应的选择性（化学、区域、立体选择性），因此也可应用于相关天然产物关键骨架的化学-酶法合成。

在深入研究多杀菌素 A (118, spinosyn A) 生物合成途径的基础上<sup>[109]</sup>，刘鸿文课题组<sup>[110]</sup>在2014

年报道了对 **118** 的化学-酶法合成 [图 11(a)]。他们利用制备的三个片段 **112**~**114**，通过 Julia-Kocienski 烯化、Stille 偶联和 Yamaguchi 大环化合成了大环内酯 **115**，后续再利用生物合成途径中的 8 个酶在一

行路易斯酸促进的糖基化反应，完成了 **118** 的合成。这里要说明的是，经 SpnJ/SpnM 作用下进行羟基脱氢和 1,4-脱水生成的 **116** 能自发地进行 [4+2]-环加成反应生成含六氢-1*H*-茛菪骨架结构的 **117**，而 SpnF 的存在能大大加速该环加成反应。

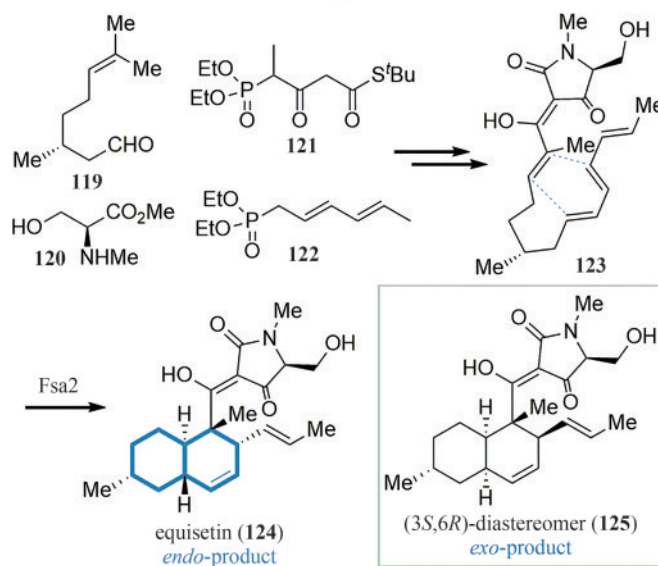
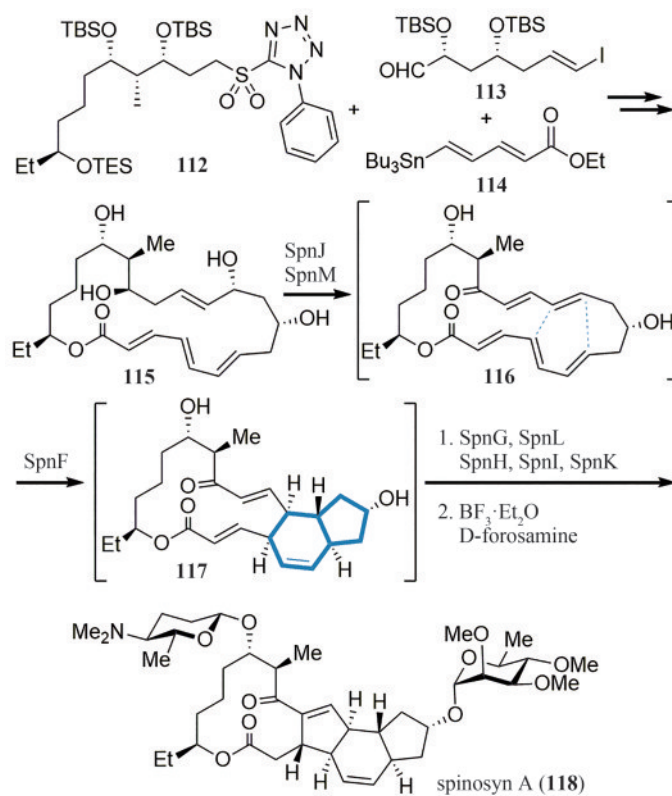


图 11 环化酶在天然产物 spinosyn A (a) 和 equisetin (b) 骨架形成中的应用

Fig. 11 Application of cyclases to the skeleton-forming step in the synthesis of spinosyn A (a) and equisetin (b)

高栓虎和刘文课题组<sup>[111]</sup>合作在2017年报道的对真菌来源的聚酮-非核糖体肽杂合天然产物 equisetin (**124**) 的化学-酶法合成 [图 11(b)]。作者从4个片段 (**119**~**122**) 出发, 根据文献的报道合成了环加成前体 **123**。当以 **124** 生物合成途径中催化环加成反应的 Fsa2 为催化剂时<sup>[112]</sup>, 实现了完全 *endo* 选择性的分子内 Diels-Alder 反应, 立体专一地形成了 **124** 中的反式十氢萘骨架; 而当使用酸或热等条件来促进 **123** 的环加成反应时, 除了需要的 *endo*-产物 **124** 外, 还生成了 *exo*-产物 **125**, 两者比例最高达到 2:1。另外, 雷晓光、戴均贵和黄璐琦等课题组合作在2020年报道在桑科植物白桑 (*Morus alba*) 中发现的具有催化分子间 Diels-Alder 反应酶<sup>[113]</sup>, 能以高对映选择性催化异戊烯基化黄酮类天然产物环己烯骨架的形成, 其中具 *endo*-选择性的 MaDA 和 MaDA-1 可用于如 chalcomoracin 等 *endo* 型天然产物的合成<sup>[113-115]</sup>, 而 MaDA-2 和 MaDA-3 可用于如 mongolicin F 等 *exo* 型天然产物的合成<sup>[115]</sup>。以上都显示了酶催化环加成反应的高选择性优势。

天然产物生物合成途径中存在着多种多样的具有催化其骨架关键碳碳形成的酶, 从序列和结构以及其催化的功能和机制上来看, 种类复杂多样, 发现并鉴定这些酶往往会为化学-酶法合成提供高效的生物催化剂。利用前期在鬼臼毒素 [**130**, (-)-podophyllotoxin] 骨架生物合成中鉴定的关键酶 2-ODD-PH<sup>[116]</sup>, Hans Renata 课题组<sup>[117]</sup> 在2019年报道了鬼臼毒素的化学-酶法合成 [图 12(a)]。他们利用烯醇的氧化偶联方式将 **126** 和 **127** 两个片段进行连接快速合成了光学纯的双苄基  $\gamma$ -丁内酯前体 **128**, 在 2-ODD-PH 的催化下能高效地形成鬼臼毒素芳基四氢萘 (aryltetralin) 骨架的 C6—C7' 碳碳键, 能以克级规模制备去氧鬼臼毒素 **129**; 最后再引入 7 $\alpha$ -羟基, 完成了 **130** 的合成。几乎在同时, Wolfgang Kroutil 和 Michael Fuchs 等<sup>[118]</sup> 报道利用 2-ODD-PH 能对消旋双苄基  $\gamma$ -丁内酯环化前体 7-hydroxyatein 进行动力学拆分, 并能超过 99% 的 ee 值得到鬼臼毒素的 7 位差向异构体, 后续氧化/还原操作即可调整 C7 位的构型, 完成鬼臼毒素的合成。值得一提的是, 两个课题组报道了 2-ODD-PH 对不同芳基取代的双苄基  $\gamma$ -丁内酯前体

均表现出较好的环化活性, 并制备了系列鬼臼毒素的同系物, 表明酶催化反应的引入在多样性合成方面有巨大的可挖掘潜力。

利用 Emily Balskus 课题组<sup>[119]</sup> 在 cylindrocyclophane 类天然产物生物合成途径中鉴定的首例傅克烷基化酶 CylK, 项征课题组<sup>[120]</sup> 在获得其晶体结构的基础上, 进行了定点突变和催化机制的研究, 并利用底物转化效率更高的突变体 CylK-L411A 催化 2 分子烷基氯代底物 **131** 以“头-尾”连接的方式进行分子间傅克烷基化反应, 形成 [7,7] 对环番骨架的 C7—C8 和 C20—C21 碳碳键, 以 6~8 步的最长线性步骤完成了 cylindrocyclophane A (**132**)、cylindrocyclophane F (**133**)、merocyclophane A (**134**) 和 merocyclophane D (**135**) 的合成 [图 12(b)]<sup>[121]</sup>。

基于在 loline 生物合成途径中鉴定的 Mannich 环化酶 LolT 和脱羧酶 LolD<sup>[122]</sup>, Hai Yang 课题组<sup>[123]</sup> 2023 年完成了 (+)-absouline (**142**) 和 (+)-laburnamine 的化学-酶法合成 [图 12(c)]。他们从简单砌块单元 **136** 和 **137** 出发制备了线性中间体 **138**, 再通过 TFA 脱除保护之后自发形成亚胺盐中间体 **139**, 在 LolT 和 LolD 的串联催化下先发生 Mannich 反应形成吡咯里西啶骨架的 C1—C7a 碳碳键, 生成的 **140** 中间体再经选择性脱羧即可得到 1-氨基吡咯里西啶 (**141**), 最后与对甲氧基肉桂酸缩合即完成 **142** 的合成。另外, LolT 和 LolD 的串联催化除了能合成 5-5 并环的吡咯里西啶骨架外, 还能以较高的效率合成 5-6 并环的吲哚里西啶、6-6 并环的喹诺里西啶以及 5-7 并环、6-7 并环等骨架。

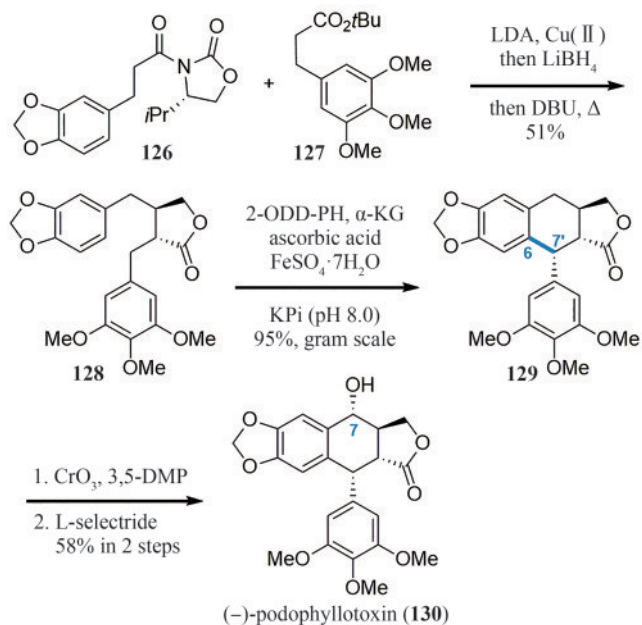
## 4 挑战与展望

酶催化反应具有条件温和、反应高效、转化精准等特点, 特别是对复杂底物以及惰性位点可选择性修饰, 使其与当前的化学合成能力互补; 再加上生物技术的发展, 酶的制备、改造和利用日趋简便, 因而使天然产物化学-酶法的合成方式逐渐受到关注, 而化学合成和生物催化的深度交叉融合又能在策略的设计和的开发等方面为天然产物合成提供多维的视角。尽管目前天然产物化学-酶法的合成实践日益丰富, 但是无论是在天然产物合成中关键骨架构筑的应用上, 还是在

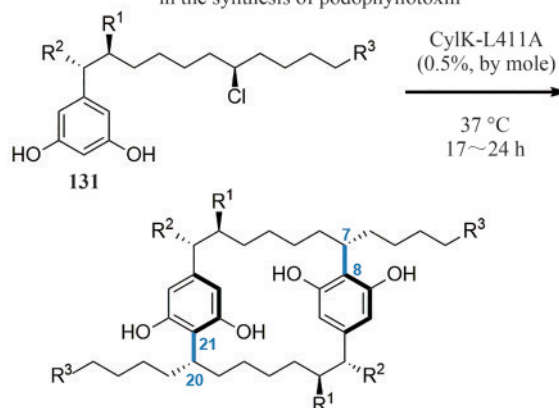
新颖酶催化反应方法学的开发上,在当前多学科融合的背景下仍然是机遇与挑战并存。

(1) 在合成策略设计方面,基于已知功能的酶催化反应作为关键步骤在天然产物骨架构筑的应用已有报道,但如何进一步拓展其原有的底物范围,突破该酶原有的生物合成途径进行应用<sup>[124]</sup>,则需要丰富的想象力和高效的酶改造手段;而基于基本化学原理的逆合成设计去寻找、开发新的酶催化反应目前依然存在很大的挑战,虽然逆生物合成分析可以在很大程度上指导对合

成途径的重构<sup>[19, 125]</sup>,但其自由度受到酶催化反应特异性和选择性的限制,在酶的反应性和底物选择性等方面都需要进行优化。与此同时,一个完备的酶催化反应数据库的建立可以为科研人员合理设计化学-酶法合成路线提供重要的参考。然而目前常用的化学反应检索数据库如 Reaxys、Scifinder等,在酶催化反应信息的收集、整理和检索上仍然存在一定的缺失,甚至许多生物催化反应都没有被收录,这给合成科学家们根据已知酶催化反应设计相应的合成路线造成了很大的不便。

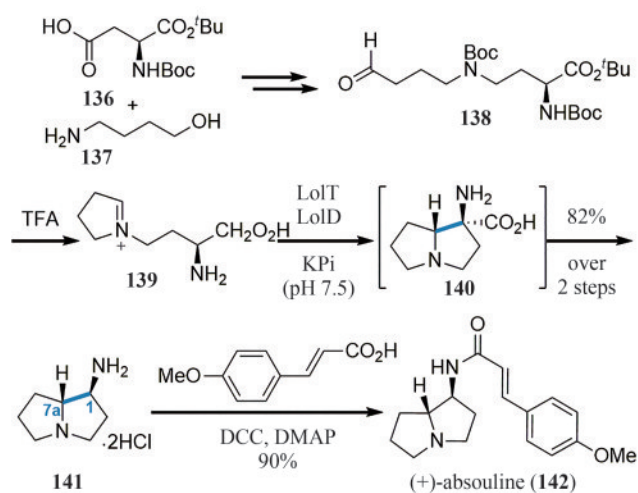


(a) 酶催化氧化在podophyllotoxin骨架形成中的应用  
(a) Application of enzyme-catalyzed oxidative skeleton formation in the synthesis of podophyllotoxin



cylindrocyclophane A (**132**):  $R^1 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ,  $R^3 = \text{H}$   
 cylindrocyclophane F (**133**):  $R^1 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{H}$   
 merocyclophane A (**134**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{H}$   
 merocyclophane D (**135**):  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$ ,  $R^3 = \text{OH}$

(b) CylK-L411A催化芳环的烷基化反应在cylindrocyclophane类天然产物合成中的应用  
(b) CylK-L411A-catalyzed aromatic alkylation reaction and its application in the synthesis of the cylindrocyclophane family natural products



(c) LolT和LolD在生物碱absouline合成中的应用  
(c) Application of LolT and LolD in the synthesis of alkaloid absouline

图12 酶催化反应形成骨架的关键碳碳键

Fig. 12 Enzyme-catalyzed reaction for the formation of key C—C bond of skeleton

此外，在建立酶催化反应数据库基础上，计算机技术如大数据处理和人工智能预测等手段的介入可以辅助合成科学家从策略的设计和开发方面为天然产物的化学-酶法合成提供更优的选择。

(2) 在合成方法开发方面，持续发现和鉴定功能多样、底物谱更广的酶以充实生物催化工具箱是支撑天然产物化学-酶法合成的基础<sup>[126]</sup>，而如何实现其反应效率的提升和制备规模的扩大是制约酶催化反应广泛应用的技术难题。这其中对天然产物生物合成途径中新颖功能酶的发现和鉴定，特别是植物和动物来源的复杂天然产物生物合成途径的解析，是发现新颖酶以及新颖催化反应的重要来源；随着测序技术的发展，利用（宏）基因组信息进行更大范围的基因组挖掘，可以为新颖酶催化反应类型的延伸和底物范围的拓展提供更广阔的空间；而对特定酶的改造和定向进化以改变其反应的选择性、提高反应效率是拓展酶催化反应适用范围的实用方式，但是受到后续反应活性筛选通量的限制，如何合理开发利用小而精的筛选模式，提高筛选的效率和成功率，也是研究人员所关注的重点；另外，基于化学原理，特别是基于辅酶和辅因子本身的反应特性，开发新的天然酶不具备的反应活性，可以进一步拓展酶催化反应空间<sup>[127]</sup>；在此基础上，可以通过密码子扩展技术进行非天然氨基酸掺入，或者进行人工

酶的设计，可以为新的蛋白骨架赋予更丰富的催化能力和效率<sup>[128]</sup>。合成生物学和代谢工程的进一步发展可以为研究人员搭建能够级联多个生物催化反应的体内/体外平台，并将其提升至制备规模以支撑天然化学-酶法合成的需求；此外，新一代合成生物技术的发展可以通过更高效地组合更多相关基因从而将其整合进多样化的宿主中，同时对底盘宿主的代谢通路进行进一步的优化改造，从而使相关底物和中间体的制备效率和规模进一步提高。

(3) 在研究人员思维方面<sup>[129]</sup>，突破专业固有的领域和手段进行多学科的交叉融合，可以为化学-酶法在天然产物合成中的创新应用提供更多维的视角。化学-酶法合成作为一个多学科交叉的领域，与之相关的各个学科其研究内容和手段往往相差很大：有机化学家往往关注关键骨架构建反应的设计和合成路线的效率；生物合成学家往往关注新天然产物的发现，以及其相关生物合成途径的解析和新颖酶促反应机制的阐释；而化学-酶法合成关注的核心是高效的酶催化反应在合成路线上的应用，以期能提高合成的效率。面对这一挑战，需要合成科学家和生物催化相关研究人员增进沟通交流，以合作的方式共同推进课题，并培养出一批具有化学和生物双重背景的科研人员。更重要的一方面，天然产物的化学-酶法合成其核

心依然是对活性分子的合成，其策略设计依然是根据基本化学原理对分子中不同化学键的切断组合；酶催化反应作为高效、专一的方法能够互补传统化学方法学的部分限制，从而在一定程度上缩短合成路线。对于合成化学家而言，在合成过程中对酶催化反应的介入应持有包容学习的态度，对活性分子的高效合成是生物催化领域的一个重要应用出口，能够更好地阐释其研究的价值。因此，化学合成和生物催化的协作对天然产物的合成能够带来双方的共赢。

### 参 考 文 献

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770-803.
- [2] CRAGG G M, NEWMAN D J. Natural products: a continuing source of novel drug leads[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2013, 1830(6): 3670-3695.
- [3] CARLSON E E. Natural products as chemical probes[J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5(7): 639-653.
- [4] PYE C R, BERTIN M J, LOKEY R S, et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(22): 5601-5606.
- [5] BUTLER M S. The role of natural product chemistry in drug discovery[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(12): 2141-2153.
- [6] KOEHN F E, CARTER G T. The evolving role of natural products in drug discovery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(3): 206-220.
- [7] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 200-216.
- [8] WILSON B A P, THORNBURG C C, HENRICH C J, et al. Creating and screening natural product libraries[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(7): 893-918.
- [9] NEWMAN D J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(9): 2589-2599.
- [10] LI L, CHEN Z, ZHANG X W, et al. Divergent strategy in natural product total synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(7): 3752-3832.
- [11] MULZER J. Trying to rationalize total synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(4): 595-603.
- [12] WENDER P A. Toward the ideal synthesis and molecular function through synthesis-informed design[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(4): 433-440.
- [13] DRAUZ K, GRÖGER H, MAY O. Enzyme catalysis in organic synthesis[M/OL]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. (2012-02-22)[2024-03-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527639861>.
- [14] RODRÍGUEZ BENÍTEZ A, NARAYAN A R H. Frontiers in biocatalysis: profiling function across sequence space[J]. *ACS Central Science*, 2019, 5(11): 1747-1749.
- [15] LEWIS R D, FRANCE S P, MARTINEZ C A. Emerging technologies for biocatalysis in the pharmaceutical industry[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(8): 5571-5577.
- [16] TRUPPO M D. Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 8(5): 476-480.
- [17] REED J H, SEEBECK F P. Reagent engineering for group transfer biocatalysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(7): e202311159.
- [18] WU S K, SNAJDROVA R, MOORE J C, et al. Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(1): 88-119.
- [19] TURNER N J, O'REILLY E. Biocatalytic retrosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(5): 285-288.
- [20] KIRSCHNING A, HAHN F. Merging chemical synthesis and biosynthesis: a new chapter in the total synthesis of natural products and natural product libraries[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(17): 4012-4022.
- [21] FRIEDRICH S, HAHN F. Opportunities for enzyme catalysis in natural product chemistry[J]. *Tetrahedron*, 2015, 71(10): 1473-1508.
- [22] MURRAY L A M, MCKINNIE S M K, MOORE B S, et al. Meroterpenoid natural products from *Streptomyces* bacteria—the evolution of chemoenzymatic syntheses[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(10): 1334-1366.
- [23] CHAKRABARTY S, ROMERO E O, PYSER J B, et al. Chemoenzymatic total synthesis of natural products[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(6): 1374-1384.
- [24] ZHANG H L, TANG X Y. Combining microbial and chemical syntheses for the production of complex natural products[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2022, 20(10): 729-736.
- [25] RODDAN R, CARTER E M, THAIR B, et al. Chemoenzymatic approaches to plant natural product inspired

- compounds[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(7): 1375-1382.
- [26] STOUT C N, WASFY N M, CHEN F, et al. Charting the evolution of chemoenzymatic strategies in the syntheses of complex natural products[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(33): 18161-18181.
- [27] BRILL Z G, CONDAKES M L, TING C P, et al. Navigating the chiral pool in the total synthesis of complex terpene natural products[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(18): 11753-11795.
- [28] BREUER M, DITRICH K, HABICHER T, et al. Industrial methods for the production of optically active intermediates[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43(7): 788-824.
- [29] FACIN B R, MELCHORS M S, VALÉRIO A, et al. Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2019, 58(14): 5358-5378.
- [30] WANG H H, ZHANG Q, YU X, et al. Application of lipase B from *Candida antarctica* in the pharmaceutical industry [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2023, 62(39): 15733-15751.
- [31] SLABU I, GALMAN J L, LLOYD R C, et al. Discovery, engineering, and synthetic application of transaminase biocatalysts[J]. *ACS Catalysis*, 2017, 7(12): 8263-8284.
- [32] TOOGOOD H S, SCRUTTON N S. Discovery, characterization, engineering and applications of ene-reductases for industrial biocatalysis[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(4): 3532-3549.
- [33] YANG L C, DENG H P, RENATA H. Recent progress and developments in chemoenzymatic and biocatalytic dynamic kinetic resolution[J]. *Organic Process Research & Development*, 2022, 26(7): 1925-1943.
- [34] EGI M, SUGIYAMA K, SANETO M, et al. A mesoporous-silica-immobilized oxovanadium cocatalyst for the lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of racemic alcohols[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(13): 3654-3658.
- [35] MATSUNAGA K, SHIBUYA M, OHIZUMI Y. Imperanene, a novel phenolic compound with platelet aggregation inhibitory activity from *Imperata cylindrica*[J]. *Journal of Natural Products*, 1995, 58(1): 138-139.
- [36] CARR J A, BISHT K S. Enantioselective synthesis of imperanene *via* enzymatic asymmetrization of an intermediary 1,3-diol[J]. *Organic Letters*, 2004, 6(19): 3297-3300.
- [37] GIBSON D T, KOCH J R, KALLIO R E. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene[J]. *Biochemistry*, 1968, 7(7): 2653-2662.
- [38] GIBSON D T, KOCH J R, SCHULD C L, et al. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. II. Metabolism of halogenated aromatic hydrocarbons[J]. *Biochemistry*, 1968, 7(11): 3795-3802.
- [39] GIBSON D T, HENSLEY M, YOSHIOKA H, et al. Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*[J]. *Biochemistry*, 1970, 9(7): 1626-1630.
- [40] ZYLSTRA G J, GIBSON D T. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(25): 14940-14946.
- [41] HUDLICKY T, GONZALEZ D, GIBSON D T. Enzymatic dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis: expanding asymmetric methodology [J]. *Aldrichimica Acta*, 1999, 32(2): 35-62.
- [42] HUDLICKY T, REED J. Celebrating 20 years of *SYNLETT*-special account on the merits of biocatalysis and the impact of *arene cis*-dihydrodiol/enantioselective synthesis[J]. *Synlett*, 2009(5): 685-703.
- [43] LEWIS S E. Applications of biocatalytic arene ipso, ortho *cis*-dihydroxylation in synthesis[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(22): 2821-2830.
- [44] TAHER E S, BANWELL M G, BUCKLER J N, et al. The exploitation of enzymatically-derived *cis*-1,2-dihydrocatechols and related compounds in the synthesis of biologically active natural products[J]. *Chemical Record*, 2018, 18(2): 239-264.
- [45] LAN P, YE S, BANWELL M G. The application of dioxygenase-based chemoenzymatic processes to the total synthesis of natural products[J]. *Chemistry, an Asian Journal*, 2019, 14(22): 4001-4012.
- [46] HUDLICKY T, PRICE J D, FAN R L, et al. Efficient and enantiodivergent synthesis of (+)- and (-)-pinitol[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, 112(25): 9439-9440.
- [47] MATVEENKO M, WILLIS A C, BANWELL M G. A chemoenzymatic synthesis of the anti-influenza agent Tamiflu® [J]. *Tetrahedron Letters*, 2008, 49(49): 7018-7020.
- [48] MA X H, BANWELL M G, WILLIS A C. Chemoenzymatic total synthesis of the phytotoxic geranylcylohexentriol (-)-phomentrioloxin[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(8): 1514-1518.

- [49] BANWELL M G, KOKAS O J, WILLIS A C. Chemoenzymatic approaches to the montanine alkaloids: a total synthesis of (+)-brunsvigine[J]. *Organic Letters*, 2007, 9(18): 3503-3506.
- [50] FINDLAY A D, BANWELL M G. A chemoenzymatic total synthesis of (+)-amabiline[J]. *Organic Letters*, 2009, 11(14): 3160-3162.
- [51] HUDLICKY T, OLIVO H F. A short synthesis of (+)-lycoricidine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(24): 9694-9696.
- [52] ENDOMA-ARIAS M A A, HUDLICKY T. Chemoenzymatic total synthesis of (+)-galanthamine and (+)-narwedine from phenethyl acetate[J]. *Chemistry*, 2016, 22(41): 14540-14543.
- [53] VARGHESE V, HUDLICKY T. Short chemoenzymatic total synthesis of *ent*-hydromorphone: an oxidative dearomatization/intramolecular [4+2] cycloaddition/amination sequence[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(17): 4355-4358.
- [54] LIN A, WILLIS A C, BANWELL M G. A chemoenzymatic and enantioselective total synthesis of the resorcylic acid lactone L-783, 290, the trans-isomer of L-783, 277[J]. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51(7): 1044-1047.
- [55] BANWELL M G, HOCKLESS D C R, MCLEOD M D. Chemoenzymatic total syntheses of the sesquiterpene (-)-patchoulone[J]. *New Journal of Chemistry*, 2003, 27(1): 50-59.
- [56] SCHWARTZ B D, MATOUŠOVÁ E, WHITE R, et al. A chemoenzymatic total synthesis of the protoilludane aryl ester (+)-armillarivin[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(8): 1934-1937.
- [57] BAKER DOCKREY S A, NARAYAN A R H. Flavin-dependent biocatalysts in synthesis[J]. *Tetrahedron*, 2019, 75(9): 1115-1121.
- [58] FAHAD A A, ABOOD A, FISCH K M, et al. Oxidative dearomatization: the key step of sorbicillinoid biosynthesis[J]. *Chemical Science*, 2014, 5(2): 523-527.
- [59] SIB A, GULDER T A M. Stereoselective total synthesis of bisorbicillinoid natural products by enzymatic oxidative dearomatization/dimerization[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(42): 12888-12891.
- [60] 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.
- [61] DAVISON J, FAHAD A A, CAI M H, et al. Genetic, molecular, and biochemical basis of fungal tropolone biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(20): 7642-7647.
- [62] ZABALA A O, XU W, CHOOI Y H, et al. Characterization of a silent azaphilone gene cluster from *Aspergillus niger* ATCC 1015 reveals a hydroxylation-mediated pyran-ring formation [J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(8): 1049-1059.
- [63] SOMOZA A D, LEE K H, CHIANG Y M, et al. Reengineering an azaphilone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans* to create lipoxygenase inhibitors[J]. *Organic Letters*, 2012, 14(4): 972-975.
- [64] PYSER J B, BAKER DOCKREY S A, BENÍTEZ A R, et al. Stereodivergent, chemoenzymatic synthesis of azaphilone natural products[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(46): 18551-18559.
- [65] HERR C Q, HAUSINGER R P. Amazing diversity in biochemical roles of Fe(II)/2-oxoglutarate oxygenases[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2018, 43(7): 517-532.
- [66] ITOH H, INOUE M. Comprehensive structure-activity relationship studies of macrocyclic natural products enabled by their total syntheses[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(17): 10002-10031.
- [67] BAUD D, SAAIDI P L, MONFLEUR A, et al. Synthesis of mono- and dihydroxylated amino acids with new  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases: biocatalytic oxidation of C—H bonds[J]. *ChemCatChem*, 2014, 6(10): 3012-3017.
- [68] ZHANG X, KING-SMITH E, RENATA H. Total synthesis of tambromycin by combining chemocatalytic and biocatalytic C—H functionalization[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(18): 5037-5041.
- [69] MATTAY J, HÜTTEL W. Pipecolic acid hydroxylases: a monophyletic clade among *cis*-selective bacterial proline hydroxylases that discriminates L-proline[J]. *ChemBioChem*, 2017, 18(15): 1523-1528.
- [70] ZWICK C R III, SOSA M B, RENATA H. Characterization of a citrulline 4-hydroxylase from nonribosomal peptide GE81112 biosynthesis and engineering of its substrate specificity for the chemoenzymatic synthesis of enduracididine [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(52): 18854-18858.
- [71] ZWICK C R III, SOSA M B, RENATA H. Modular chemoenzymatic synthesis of GE81112 B1 and related analogues enables elucidation of its key pharmacophores[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(3): 1673-1679.

- [72] FAN J, LIAO G, KINDINGER F, et al. Peniphenone and penilactone formation in *Penicillium crustosum* via 1,4-Michael additions of ortho-quinone methide from hydroxyclovatol to  $\gamma$ -butyrolactones from crustosic acid[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(10): 4225-4229.
- [73] DOYON T J, PERKINS J C, BAKER DOCKREY S A, et al. Chemoenzymatic *o*-quinone methide formation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(51): 20269-20277.
- [74] ROMERO E O, PERKINS J C, BURCH J E, et al. Chemoenzymatic synthesis of (+)-xyloketal B[J]. *Organic Letters*, 2023, 25(9): 1547-1552.
- [75] ASAI T, YAMAMOTO T, SHIRATA N, et al. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(13): 3346-3349.
- [76] ASAI T, TSUKADA K, ISE S, et al. Use of a biosynthetic intermediate to explore the chemical diversity of pseudo-natural fungal polyketides[J]. *Nature Chemistry*, 2015, 7(9): 737-743.
- [77] SÁNCHEZ C, MÉNDEZ C, SALAS J A. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity[J]. *Natural Product Reports*, 2006, 23(6): 1007-1045.
- [78] BLAIR L M, SPERRY J. Total syntheses of ( $\pm$ )-spiroindimicins B and C enabled by a late-stage Schöllkopf-Magnus-Barton-Zard (SMBZ) reaction[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(4): 800-802.
- [79] ZHANG Z, RAY S, IMLAY L, et al. Total synthesis of (+)-spiroindimicin A and congeners unveils their antiparasitic activity[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(30): 10388-10394.
- [80] ZHENG X K, LI Y, GUAN M T, et al. Biomimetic total synthesis of the spiroindimicin family of natural products[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(38): e202208802.
- [81] BUREAU J A, OLIVA M E, DONG Y M, et al. Engineering yeast for the production of plant terpenoids using synthetic biology approaches[J]. *Natural Product Reports*, 2023, 40(12): 1822-1848.
- [82] SIEMON T, WANG Z Q, BIAN G K, et al. Semisynthesis of plant-derived englerin A enabled by microbe engineering of guaia-6,10(14)-diene as building block[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(6): 2760-2765.
- [83] MOU S B, XIAO W, WANG H Q, et al. Syntheses of epoxyguaiane sesquiterpenes (-)-englerin A, (-)-oxyphyllol, (+)-orientalol E, and (+)-orientalol F: a synthetic biology approach[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(5): 1976-1979.
- [84] MOU S B, XIAO W, WANG H Q, et al. Syntheses of the carotane-type terpenoids (+)-schisanwilsonene A and (+)-tormesol via a two-stage approach[J]. *Organic Letters*, 2021, 23(2): 400-404.
- [85] ZHOU Q H, CHEN X F, MA D W. Asymmetric, protecting-group-free total synthesis of (-)-englerin A[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(20): 3513-3516.
- [86] MOLAWI K, DELPONT N, ECHAVARREN A M. Enantioselective synthesis of (-)-englerins A and B[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(20): 3517-3519.
- [87] GAYDOU M, MILLER R E, DELPONT N, et al. Synthesis of (+)-schisanwilsonene A by tandem gold-catalyzed cyclization/1,5-migration/cyclopropanation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(25): 6396-6399.
- [88] LIU C G, CUI X Y, CHEN W, et al. Synthesis of oxygenated sesquiterpenoids enabled by combining metabolic engineering and visible-light photocatalysis[J]. *Chemistry*, 2022, 28(46): e202201230.
- [89] HSU S Y, PERUSSE D, HOUGARD T, et al. Semisynthesis of the neuroprotective metabolite, serofendic acid[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2397-2403.
- [90] BOTAS A, EITEL M, SCHWARZ P N, et al. Genetic engineering in combination with semi-synthesis leads to a new route for gram-scale production of the immunosuppressive natural product brasilicardin A[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(24): 13536-13541.
- [91] NAKANO C, KUDO F, EGUCHI T, et al. Genome mining reveals two novel bacterial sesquiterpene cyclases: (-)-germacradien-4-ol and (-)-*epi*- $\alpha$ -bisabolol synthases from *Streptomyces citricolor*[J]. *ChemBioChem*, 2011, 12(15): 2271-2275.
- [92] GRANT P S, MEYRELLES R, GAJSEK O, et al. Biomimetic cationic cyclopropanation enables an efficient chemoenzymatic synthesis of 6,8-cycloeudesmanes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(10): 5855-5863.
- [93] HONG B K, LUO T P, LEI X G. Late-stage diversification of natural products[J]. *ACS Central Science*, 2020, 6(5): 622-635.
- [94] DECORTE B L. Underexplored opportunities for natural products in drug discovery[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(20): 9295-9304.
- [95] FASAN R D. Tuning P450 enzymes as oxidation catalysts[J]. *ACS Catalysis*, 2012, 2(4): 647-666.
- [96] MÜNCH J, PÜLLMANN P, ZHANG W Y, et al. Enzymatic

- hydroxylations of sp<sup>3</sup>-carbons[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(15): 9168-9203.
- [97] WHITEHOUSE C J C, BELL S G, WONG L L. P450<sub>BMS</sub> (CYP102A1): connecting the dots[J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(3): 1218-1260.
- [98] LOSKOT S A, ROMNEY D K, ARNOLD F H, et al. Enantioselective total synthesis of nigelladine A *via* late-stage C—H oxidation enabled by an engineered P450 enzyme[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(30): 10196-10199.
- [99] LI J, LI F Z, KING-SMITH E, et al. Merging chemoenzymatic and radical-based retrosynthetic logic for rapid and modular synthesis of oxidized meroterpenoids[J]. Nature Chemistry, 2020, 12(2): 173-179.
- [100] LI F Z, RENATA H. A Chiral-Pool-Based strategy to access *trans-syn*-fused drimane meroterpenoids: chemoenzymatic total syntheses of polysin, *N*-acetyl-polyveoline and the chrodriamans[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(43): 18280-18286.
- [101] LI J, CHEN F, RENATA H. Concise chemoenzymatic synthesis of gedunin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(42): 19238-19242.
- [102] LI F Z, DENG H P, RENATA H. Remote B-ring oxidation of sclareol with an engineered P450 facilitates divergent access to complex terpenoids[J]. Journal of the American Chemical Society, 2022, 144(17): 7616-7621.
- [103] DONG L B, ZHANG X, RUDOLF J D, et al. Cryptic and stereospecific hydroxylation, oxidation, and reduction in platensimycin and platencin biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(9): 4043-4050.
- [104] RUDOLF J D, DONG L B, MANOOGIAN K, et al. Biosynthetic origin of the ether ring in platensimycin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(51): 16711-16721.
- [105] ZHANG X, KING-SMITH E, DONG L B, et al. Divergent synthesis of complex diterpenes through a hybrid oxidative approach[J]. Science, 2020, 369(6505): 799-806.
- [106] ZHAO Y, ZHANG B, SUN Z Q, et al. Biocatalytic C14-hydroxylation on androstenedione enabled modular synthesis of cardiotonic steroids[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(16): 9839-9845.
- [107] SONG F Z, ZHENG M M, WANG J L, et al. Chemoenzymatic synthesis of C14-functionalized steroids[J]. Nature Synthesis, 2023, 2(8): 729-739.
- [108] JAMIESON C S, OHASHI M, LIU F, et al. The expanding world of biosynthetic pericyclases: cooperation of experiment and theory for discovery[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(5): 698-713.
- [109] KIM H J, RUSZCZYCKY M W, CHOI S H, et al. Enzyme-catalysed [4+2] cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A[J]. Nature, 2011, 473(7345): 109-112.
- [110] 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.
- [111] LI X J, ZHENG Q F, YIN J, et al. Chemo-enzymatic synthesis of equisetin[J]. Chemical Communications, 2017, 53(34): 4695-4697.
- [112] KATO N, NOGAWA T, HIROTA H, et al. A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 460(2): 210-215.
- [113] GAO L, SU C, DU X X, et al. FAD-dependent enzyme-catalysed intermolecular [4+2] cycloaddition in natural product biosynthesis[J]. Nature Chemistry, 2020, 12(7): 620-628.
- [114] LIU X J, YANG J, GAO L, et al. Chemoenzymatic total syntheses of artonin I with an intermolecular Diels-Alderase [J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(11): e2000119.
- [115] GAO L, ZOU Y K, LIU X J, et al. Enzymatic control of *endo*- and *exo*-stereoselective Diels-Alder reactions with broad substrate scope[J]. Nature Catalysis, 2021, 4(12): 1059-1069.
- [116] LAU W, SATTELY E S. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone [J]. Science, 2015, 349(6253): 1224-1228.
- [117] LI J, ZHANG X, RENATA H. Asymmetric chemoenzymatic synthesis of (-)-podophyllotoxin and related aryltetralin lignans [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(34): 11657-11660.
- [118] 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.
- [119] NAKAMURA H, SCHULTZ E E, BALSUS E P. A new strategy for aromatic ring alkylation in cylindrocyclophane biosynthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(8): 916-921.
- [120] WANG H Q, MOU S B, XIAO W, et al. Structural basis for the Friedel-Crafts alkylation in cylindrocyclophane biosynthesis [J]. ACS Catalysis, 2022, 12(3): 2108-2117.
- [121] CHEN K Y, WANG H Q, YUAN Y, et al. Chemoenzymatic synthesis of cylindrocyclophanes A and F and merocyclophanes A

- and D[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(46): e202307602.
- [122] GAO J M, LIU S N, ZHOU C, et al. A pyridoxal 5'-phosphate-dependent Mannich cyclase[J]. *Nature Catalysis*, 2023, 6: 476-486.
- [123] LIU S N, HAI Y. Chemoenzymatic approaches to izidine alkaloids: an efficient total synthesis of (+)-absoulone and laburnamine[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(24): 15725-15729.
- [124] WU X M, GUAN Q Y, HAN Y B, et al. Regeneration of phytochemicals by structure-driven organization of microbial biosynthetic steps[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(8): e202114919.
- [125] KIEFER A F, LIU Y C, GUMMERER R, et al. An artificial *in vitro* metabolism to angiopterlactone B inspired by traditional retrosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(23): e202301178.
- [126] YI D, BAYER T, BADENHORST C P S, et al. Recent trends in biocatalysis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(14): 8003-8049.
- [127] YANG Y, ARNOLD F H. Navigating the unnatural reaction space: directed evolution of heme proteins for selective carbene and nitrene transfer[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(5): 1209-1225.
- [128] PAN Y J, LI G B, LIU R X, et al. Unnatural activities and mechanistic insights of cytochrome P450 PikC gained from site-specific mutagenesis by non-canonical amino acids[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 1669.
- [129] ROMERO E O, SAUCEDO A T, HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ

J R, et al. Enabling broader adoption of biocatalysis in organic chemistry[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(8): 2073-2085.



**通讯作者:** 徐正仁(1983—),男,研究员,博士生导师。研究方向为活性天然产物的化学-酶法合成、新颖生物催化反应的发现与应用、天然药物化学等。  
E-mail: zhengrenxu@bjmu.edu.cn



**第一作者:** 张守祺(1998—),男,博士研究生。研究方向为活性二萜的化学-酶法合成。  
E-mail: shouqizhang\_pku@pku.edu.cn



**第一作者:** 王涛(1991—),男,博士研究生。研究方向为活性二萜的化学-酶法合成。  
E-mail: 1005704167@qq.com