

脱氧核糖醛缩酶与醇脱氢酶共催化合成 (3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯

旋凯昂^{1,2}, 张荣珍^{*1,2}, 饶俊超^{1,2}, 徐岩^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业微生物教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为实现生物法“一步”合成他汀类药物侧链中间体(3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯, 采用生物偶联的方法分别构建不同抗性的两种重组质粒, 即来源于 *Streptococcus suis* 的脱氧核糖醛缩酶基因与 *Lodderomyces elongisporus* 的醇脱氢酶基因的重组质粒, 将两种重组质粒共转化于大肠杆菌 BL21 同一细胞中, 实现两种酶的可溶性共表达。以重组大肠杆菌为生物催化剂, 全细胞催化两种底物: 400 mmol/L 乙醛与 200 mmol/L 氯乙醛发生反应, 获得产物 (3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯。在缺少标准产物对照的条件下, 利用质谱(MS)以及氢谱(¹H-NMR)进行产物鉴定, 最终确定合成的产物为他汀类药物侧链中间体(3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯。

关键词: 他汀类药物侧链中间体; (3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯; 生物偶联; 全细胞催化; 产物鉴定

中图分类号: Q 819 文章编号: 1673-1689(2021)02-0025-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.004

Co-Catalysis of Deoxyribose Aldolase and Alcohol Dehydrogenase to Generate (3R,5S)-6-Chloro-2,4,6-Trideoxy-Erythro-Hexonolactone

XUAN Kaiang^{1,2}, ZHANG Rongzhen^{*1,2}, RAO Junchao^{1,2}, XU Yan^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The biological coupling method was used in tandem with the enzyme reaction process to synthesize (3R,5S)-6-chloro-2,4,6-trideoxy-erythro-hexonolactone, the statin side-chain intermediate, in 'one-step' bio-synthesis. The recombinant plasmids of *Streptococcus suis* deoxyribose aldolase gene and *Lodderomyces elongisporus* alcohol dehydrogenase gene were co-transformed into the same cell of *Escherichia coli* BL21 to realize their soluble co-expression. (3R,5S)-6-chloro-2,4,6-trideoxy-erythro-hexonolactone was obtained by the whole cell co-catalysis of 400 mmol/L acetaldehyde and 200 mmol/L chloroacetaldehyde using recombinant *E. coli* was used as the biocatalysts. In the absence of standard products, mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic

收稿日期: 2020-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31970045); 江苏省“六大人才”高峰高层次人才项目(2015-SWYY-010); 国家轻工技术与工程双一流学科项目(LITE2018-12); 高校人才引进项目(111-2-06); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目。

* 通信作者: 张荣珍(1973—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物催化和酶工程研究。E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

resonance were performed to identify the products. The final product was determined as the statin side-chain intermediate (3R,5S)-6-chloro-2,4,6-trideoxy-erythro-hexonolactone.

Keywords: side chain intermediate, (3R,5S)-6-chloro-2,4,6-trideoxy-erythro-hexonolactone, biological coupling, whole-cell catalysis, product identification

他汀类药物即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂是目前最畅销的降脂类药物,同时它也是治疗动脉粥样硬化、冠心病、骨质疏松症、抗肿瘤和抗老年痴呆症等多种疾病的药物^[1-3]。其中阿托伐他汀钙(利普妥)因其治疗效果好且副作用小,销量最好^[4]。他汀类药物的生产可以通过将母体环部分和侧链部分分开合成,然后以适当方式链接在一起达到合成的目的,其中侧链部分具有相似的结构,可由手性中间体进行合成^[5-6]。药物手性中间体的合成可有多种化学方法,但通常合成步骤多,且反应条件苛刻,环境污染大。在开拓药物合成上,如果能实现缩短反应合成步骤,且使反应条件更温和并减少环境污染,提供绿色可持续制备策略,这是研究者们努力研究的方向^[7]。

近年来,在他汀类药物侧链中间体的合成研究中,利用 2-脱氧-D-核糖-5-磷酸醛缩酶(DERA, EC 4.1.2.4)结合化学氧化法合成他汀类侧链中间体的方法最为有效,其反应过程步骤最少且原子利用率高^[8-12]。DERA 作为惟一的乙醛依赖型醛缩酶,能够利用简单易获取的乙醛和氯乙醛作为底物,进行连续两次羟醛加成反应,且不需要辅底物的添加就可催化生成产物(3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧吡喃己糖(CTeHP)。在此基础上,可进一步通过化学法被区域选择性氧化获得(3R,5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯(CTeHL)。CTeHL 可作为合成阿托伐他汀侧链部分的中间体^[13],反应过程见图 1。

关于 DERA 参与反应的研究报道,最早是发现来源于大肠杆菌 *Escherichia coli* 的脱氧核糖醛缩酶能够催化此反应过程^[14],但此野生型酶对醛类底物耐受性差,催化效率低。近年来,有报道发现来自其他微生物的 DERA 催化此反应的能力^[15],如来源于 *Lactobacillus brevis* 的 DERA^[16]。而涉及立体选择性氧化中间物 CTeHP 形成目标产物 CTeHL 的反应过程中,通常采用溴滴加氧化或次氯酸钠和乙酸进行选择氧化等化学方法^[8,17]。然而利用生物酶法选择性氧化的报道较少,目前仅有两篇相关报道。一

个是来自大肠杆菌作为膜蛋白表达的吡咯喹啉醌 PQQ 依赖型葡萄糖脱氢酶^[18],另一个是来源于 *Lodderomyces elongisporus* 菌的 NADP⁺依赖型醇脱氢酶 LeADH^[19]。但是关于串联两个反应过程,即 DERA 催化合成 CTeHP 和醇脱氢酶催化合成 CTeHL,利用生物偶联的方法整合两个催化反应,实现一步法催化合成终产物 CTeHL 没有相关报道。

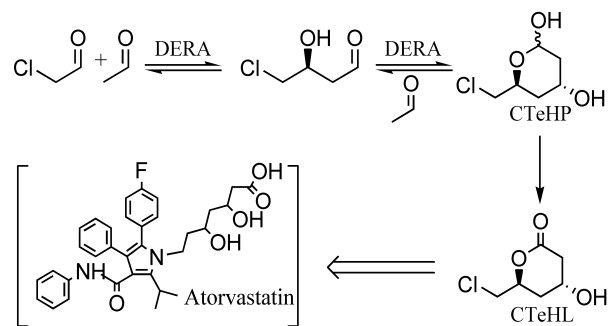


图 1 阿托伐他汀侧链中间体的合成反应过程

Fig. 1 Reaction synthesis of atorvastatin side-chain intermediate

通过分别构建来自 *Streptococcus suis* 的脱氧核糖醛缩酶 SsDERA 和来自 *Lodderomyces elongisporus* 的醇脱氢酶 LeADH 的重组质粒,共转化于一个大肠杆菌 BL21 细胞中,生物偶联两个酶用于催化 CTeHL 的合成反应。利用构建的重组菌株全细胞酶串联催化反应合成路径,实现直接从底物到终产物 CTeHL 的合成过程,提供了一种绿色无污染的他汀类侧链中间体 CTeHL 的“一步”生物合成策略及产物鉴定的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及主要试剂 *Escherichia coli* BL21 (DE3)感受态细胞:Novagen 公司;蛋白胨和酵母粉:BD 公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖 IPTG:宝生物工程(大连)有限公司(Takara);体积分数 40%乙醛与 40%氯乙醛水溶液:国药集团;工业级辅酶 NADP⁺:

贵州科奥德生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器与设备 超声破碎仪 VCX750;购自美国 Sonic 公司;蛋白质电泳仪:购自 Bio-Rad 公司;TSQ8000 三重四级杆气质联用仪:购自赛默飞世尔科技有限公司;全数字化核磁共振波谱仪:购自德国布鲁克公司;旋转蒸发仪:购自瑞士步琪公司;超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱联用仪(型号 X500R):购自美国 AB SCIEX 公司。

1.2 目的基因的选取与质粒合成

1.2.1 目标基因的选取 目标基因的序列是通过在美国国立生物技术信息中心(NCBI)的蛋白质数据库选取,并分别确认来自 *Streptococcus suis* 菌株的脱氧核糖醛缩酶的序列(GenBank ID:WP_002935276.1)和来自 *Lodderomyces elongisporus* 菌株的醇脱氢酶(GenBank ID:XP_001527075.1)的序列信息。

1.2.2 密码子优化和基因合成 所找寻的两种酶的蛋白质序列由无锡天霖生物技术有限公司合成,并对序列进行密码子优化以适宜在 *E.coli* 宿主菌中表达。SsDERA 的基因合成到质粒载体 pET28 上,获得重组质粒 pET28-SsDERA,从 5'-3'基因序列酶切位点分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I;LeADH 的基因合成到质粒载体 pET21 上,获得重组质粒 pET21-LeADH,从 5'-3'基因序列酶切位点为 *Bam*H I 和 *Xho* I,其中 LeADH 目标基因序列的终止密码子 TAA 去除。

1.3 目的菌株的构建及蛋白质表达

1.3.1 目的菌株的构建 两重组质粒 pET28-SsDERA 和 pET21-LeADH,分别包含不同的抗性基因,前者是卡那霉素抗性,后者为氨苄霉素抗性。利用质粒共转化的方法使两个重组质粒导入同一 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中,能在含有卡那与氨苄的双抗性固体培养平板上生长的克隆为带有两个不同重组质粒的目的菌株 *E. coli* BL21/pET28-SsDERA/pET21-LeADH。

1.3.2 菌体的培养及蛋白质表达 将重组菌 *E. coli* BL21/pET28-SsDERA/pET21-LeADH 接种到含 50 μ g/mL 卡那霉素和 100 μ g/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 8 h 后,转接到 1 L 相同培养基中,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,向培养基中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,于

25 $^{\circ}$ C 诱导培养 10 h 后,收集菌体。取收集后的菌体 0.5 g 溶于 10 mL 的 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液中,超声破碎,开 2 s 停 3 s,破碎后的菌体在 4 $^{\circ}$ C 条件下,12 000 g 离心 10 min,上清液与沉淀分开。样品经处理后,分别用于 9 g/dL 的 SDS-PAGE 电泳检测分析,确定两个目的蛋白质脱氧核糖醛缩酶和醇脱氢酶的可溶性表达情况。

1.4 全细胞催化反应及体系优化

1.4.1 全细胞催化反应及产物前处理 将收集的菌体用生理盐水洗涤,4 $^{\circ}$ C 下除去上清液,重复 3 次,离心即获得湿菌体,称取 0.8 g 的湿菌体用于生物催化反应。

反应体系:在 10 mL 的 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)中,加入 200 mmol/L 氯乙醛和 400 mmol/L 乙醛,然后加入 200 mmol/L 的 NADP⁺和 0.8 g 的 *E. coli* BL21/pET28-SsDERA/pET21-LeADH 湿菌体,于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下反应 16 h。

前处理过程:反应液于 12 000 g 离心 10 min,除去菌体后,取上清液用 10 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,收集萃取液,加入无水 Na₂SO₄ 除水静置。

1.4.2 高分辨 LC-MS 检测 样品前处理:样品溶于纯甲醇溶剂中,用 0.22 μ m 有机微孔滤膜过滤,备用。

液相条件:色谱柱为 Kinetex 2.6 μ C18 100A (100 mm $\times$ 2.1 mm),流量为 0.3 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C。流动相 A 为乙腈,B 为体积分数 0.1%甲酸水,梯度为:0~1 min,98% B;1~6 min,98% B 到 5% B;6~8 min,5% B;进样量为 1 μ L。

质谱条件:离子源温度为 350 $^{\circ}$ C,去簇电压 DP 为 80 V,碰撞能量为 10 eV,正离子模式,扫描范围 100~1 500。

1.4.3 反应体系 pH 的优化 反应体系的缓冲溶液替换为不同 pH 缓冲溶液,梯度设定为 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液和 pH 值为 8.5、9.0 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。反应体系按比例减小为 2 mL,经反应完成后按照 1.4.1 的方法分别进行前处理,通过气质质谱 GC-MS 进行产物含量对比分析,确定最适反应 pH^[20]。

气质检测条件:柱子选用 HP-5 非极性柱(30 m $\times$ 250 mm $\times$ 0.25 mm)。1 μ L 的进样量,分流比为 19:1,氮气作为载气,压力为 100 KPa。升温程序设定为 50 $^{\circ}$ C 保持 5 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C

(5 min), 检测器温度为 250 ℃。

1.5 目的产物分离及鉴定

在最适反应 pH 条件下, 重组菌株在 2×10 mL 催化反应体系下按照方法 1.4.1 处理, 萃取液样品进行旋蒸, 得到的产物经过硅胶色谱柱进行样品纯化, 制备获得目标产物 CTeHL。其中, 硅胶柱纯化所用洗脱液为乙酸乙酯(EA)与石油醚(PE), $V_{EA}:V_{PE}=1:3$; 硅胶板所用展开剂为 $V_{PE}:V_{EA}:V_{乙酸}=20:10:1$, 显色剂选用 5% 的硫酸乙醇溶液。收集洗脱液, 通过薄层色谱(TLC)硅胶板确定洗脱产物位置, 并将得到的洗脱产物溶于氘代氯仿中, 控制质量浓度为 40 mg/mL, 进行核磁共振(1H -NMR)鉴定, 并计算反应得到目标产物 CTeHL 的生成率。

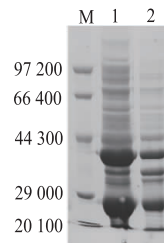
2 结果与讨论

2.1 菌株构建及蛋白表达分析

按照方法 1.3.1, 将合成的两个重组质粒 pET28-SsDERA 和 pET21-LeADH 共转化入同一感受态细胞中, 获得目标重组菌株 *E. coli* BL21/pET28-SsDERA/pET21-LeADH。按照 1.3.2 的方法进行重组菌株培养, 收集的菌体溶解于缓冲液后, 进行细胞破碎。离心收集破碎后的菌液, 上清液与沉淀分开, 分别经过蛋白质变性处理后, 用于 SDS-PAGE 的分析, 结果见图 2。其中来自 *Streptococcus suis* 的脱氧核糖醛缩酶理论蛋白质相对分子质量为 22 970, 来自 *Lodderomyces elongisporus* 的醇脱氢酶理论蛋白质相对分子质量为 37 340。从图 2 蛋白质条带可以看到, 电泳图中两条明显的目的条带与它们的理论相对分子质量加上 6×His 标签的蛋白质大小一致, 说明两个蛋白质 SsDERA 和 LeADH 均正确表达, 且表达量较高。由此说明, 两个酶均在共转化大肠杆菌细胞中实现了高效表达, 此重组菌株可进一步应用于生物催化反应。

2.2 全细胞催化反应及产物获取

为了确定构建的重组菌株是否具有“一步”催化反应过程的能力, 实现由底物乙醛与氯乙醛反应, 直接合成得到目标产物 CTeHL。我们利用此重组菌株进行全细胞催化反应, 并对获取的反应产物进行分析检测。其中, 催化反应体系按照方法 1.4.1 进行操作。反应完成后的样品经过方法 1.4.1 前处理过程, 用旋转蒸发器除去乙酸乙酯溶剂, 最终可以得到黄色油脂状的产物, 并对产物样品进行分析检测。



M: Marker; 1: 菌体上清液; 2: 菌体沉淀

图 2 重组蛋白质 SsDERA 和 LeADH 表达 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant SsDERA and LeADH expression

2.3 LC-MS 检测结果

由于没有市售的标准品用于比对, 需建立确定目标产物的检测方法。在获得黄色油脂状粗产物后, 为确认其是否含有 CTeHL, 称取部分样品按照方法 1.4.2 前处理后, 经由 LC-MS 分析检测。其中液相质谱的检测条件设定按照方法 1.4.2 所示, 经分析处理后, 物质检测结果见图 3。目标产物 (3R, 5S)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯 ($C_6H_9ClO_3$), 单一同位素的理论质荷比 (m/z) 为 164.024 0, 加 H^+ 峰的质荷比为 165.031 3, 实测结果为 165.031 4, 结果一致。由此可以确认粗产物中含有目标产物 CTeHL, 其物质结构还需进一步检测。

2.4 GC-MS 分析催化反应体系对 pH 优化

在生物催化反应中, 反应体系的 pH 影响酶的催化反应效率。有研究报道称目标产物 CTeHL 在 pH 值大于 8.0 的溶液条件下, 其稳定性不强^[19]。为了进一步测定在全细胞催化反应体系下重组菌株的最适反应 pH, 选择在 pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 梯度条件下进行测定。

在不同的 pH 缓冲液中, 反应样品按照方法 1.4.3 进行催化反应。由于目标产物没有标准品用来进行定量分析, 通过利用萃取产物在气相质谱测定下产物的碎片离子峰结果与相关研究报道文章^[21]中 CTeHL 的分析结果进行比对, 确定结果一致, 并最终确定目标产物出峰时间和位置。气相质谱的检测条件按照方法 1.4.3 设置, GC-MS 图谱结果见图 4。其中 18.62 min 的出峰位置为目标产物 CTeHL 的出峰位置。在控制样品处理过程和检测进样量相同的条件下, 通过对不同 pH 反应液样品中目标产物出峰位置的峰面积比来进行比较, 确定全细胞催化反应体系下的最适 pH。通过结果分析计算, 在不同

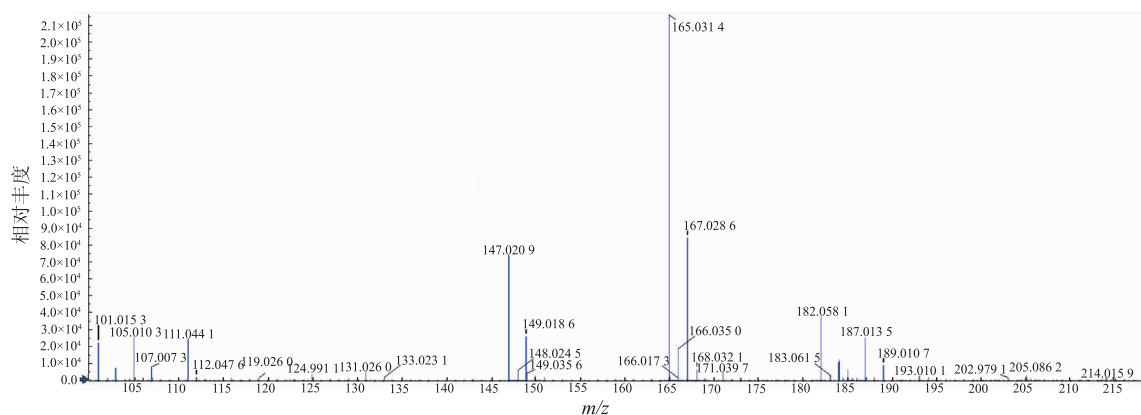


图3 质谱分析结果

Fig. 3 Mass spectrometry analysis

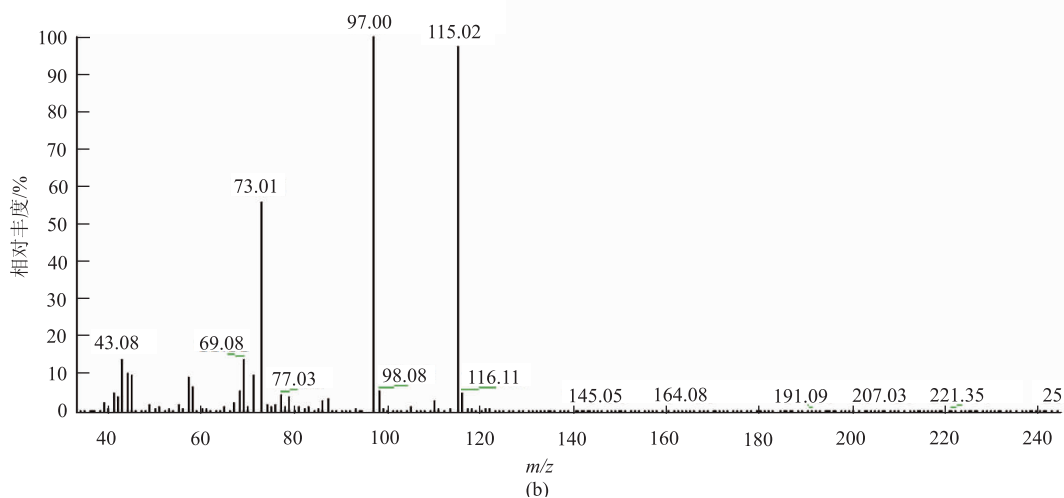
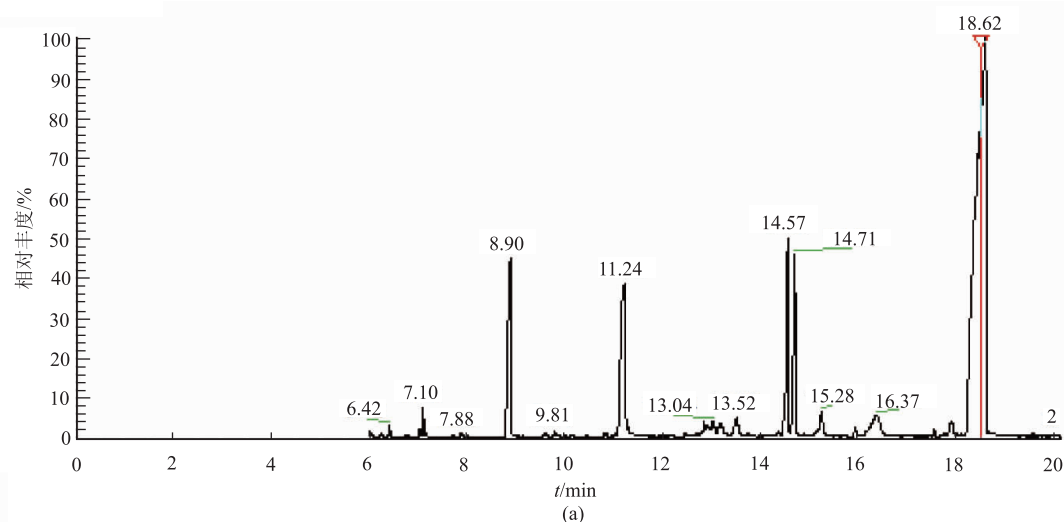


图4 粗产物气质联用图谱

Fig. 4 GC-MS of crude product

pH 缓冲液条件下,得到的重组菌株催化效能相对百分比见图 5。

在 pH 7.5 的缓冲体系下,重组菌株反应催化生成目标产物 CTeHL 的产率是最高的。

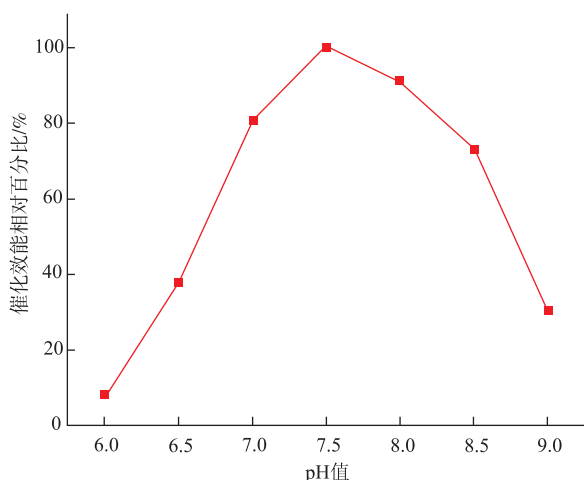


图 5 不同 pH 缓冲液下重组菌株催化效能相对百分比

Fig. 5 Relative percentage of catalytic efficiency of the recombinant strain under different pH buffers

2.5 CTeHL 的获取及鉴定

在利用液相质谱联用仪确定了合成得到的黄色油脂状粗产物物质中含有目标产物相对分子质量后,为了进一步确认产物结构是否正确,我们利用硅胶柱层析色谱分离的方法对粗产物进行纯化,进而对制备纯化得到的物质用氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 进行产物鉴定。确认重组菌株全细胞催化反应条件下最适缓冲体系 pH 7.5 后,在最适反应缓冲体系条件下,按照方法 1.5 进行合成反应,反应液处理后得到的粗产物同样按照方法 1.5 用于硅胶柱纯化制备目标产物,洗脱样品薄层色谱 (TLC) 点板的结果见图 6。收集得到的洗脱样品,旋蒸除去溶剂后,得到目标样品。取部分样品溶于氘代氯仿中,进行 $^1\text{H-NMR}$ 鉴定,结果确定分离得到的目标样品就是 (3*R*,5*S*)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯。最终,分离得到的样品

质量为 162.95 mg,理论上底物全部转化完全应得到 662.40 mg,因此重组菌株在 pH 7.5 缓冲液反应体系下催化得到目标产物 CTeHL 的产率为 24.6%。CTeHL 氢谱结果为: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) CDCl_3 δ 为 1.98~2.04 (m, 1H), 2.62 (d, 2H), 3.01 (d, 1H), 3.59~3.74 (dd, 2H), 4.39 (d, 1H), 4.90~4.96 (m, 1H)。



图 6 TLC 产物分析结果

Fig. 6 TLC product analysis

3 结 语

采用生物偶联法,把两个分别携带有不同基因的重组质粒 pET28-SsDERA 和 pET-21-LeADH 导入同一感受态 *E.coli* BL21 细胞中,构建重组菌株 *E. coli* BL21/pET28-SsDERA/pET21-LeADH。SsDERA 催化的反应过程存在反应平衡,LeADH 的参与反应有助于推动反应平衡向目标终产物合成的方向移动,提高底物的转化率和产物合成率。以两种酶共表达的重组菌株为生物催化剂,串联催化整个反应过程,实现了重组菌株“一步”催化底物乙醛与氯乙醛,直接生成得到他汀类药物侧链中间体 (3*R*,5*S*)-6-氯-2,4,6-三脱氧己内酯的生物合成方法并鉴定了目标产物。对利用生物偶联法完全合成他汀类药物侧链中间体进行了探索性的研究,为进一步相关研究提供了借鉴。

参考文献:

- [1] HOYOS P, PACE V, ALCANTARA A. Biocatalyzed synthesis of statins: a sustainable strategy for the preparation of valuable drugs[J]. *Catalysts*, 2019, 9(3): 260.
- [2] CASAR Z. Historic overview and recent advances in the synthesis of super-statins[J]. *Current Organic Chemistry*, 2010, 14(8): 816-845.
- [3] TOBERT J A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2(7): 517-526.
- [4] PATEL J M. Biocatalytic synthesis of atorvastatin intermediates[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 61

- (3):123-128.
- [5] HARIDAS M, ABDELRAHEEM E M M, HANEFELD U. 2-deoxy-*D*-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018, 102(23):9959-9971.
 - [6] OSLAJ M, CLUZEAU J, ORKIC D, et al. A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis[J]. **PLoS One**, 2013, 8(5):e62250.
 - [7] PATEL R N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2018, 26(7):1252-1274.
 - [8] GREENBERG W A, VARVAK A, HANSON S R, et al. Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004, 101(16):5788-5793.
 - [9] 韩磊, 陈曦, 冯进辉, 等. 来自 *Staphylococcus aureus* N315 的 2-脱氧-*D*-核糖-5-磷酸醛缩酶的工程菌构建、表达纯化与性质鉴定[J]. **生物加工过程**, 2013, 11(1):47-53.
 - [10] FEI H, ZHENG C-C, LIU X-Y, et al. An industrially applied biocatalyst: 2-deoxy-*D*-ribose-5-phosphate aldolase[J]. **Process Biochemistry**, 2017, 63(1):55-59.
 - [11] KULLARTZ I, PIETRUSZKA J. Cloning and characterisation of a new 2-deoxy-*D*-ribose-5-phosphate aldolase from *Rhodococcus erythropolis*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2012, 161(2):174-180.
 - [12] SAKURABA H, YONEDA K, YOSHIHARA K, et al. Sequential aldol condensation catalyzed by hyperthermophilic 2-deoxy-*D*-ribose-5-phosphate aldolase[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(22):7427-7434.
 - [13] JENNEWAIN S, SCHURMANN M, WOLBERG M, et al. Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-*D*-ribose-5-phosphate aldolase[J]. **Biotechnology Journal**, 2006, 1(5):537-548.
 - [14] BARBAS C F, WANG Y F, WONG C H. Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a synthetic catalyst[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 1990, 112(5):2013-2014.
 - [15] YOU Z Y, LIU Z Q, ZHENG Y G, et al. Characterization and application of a newly synthesized 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2013, 40(1):29-39.
 - [16] JIAO X C, PAN J, XU G C, et al. Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new aldehyde-tolerant aldolase identified from *Lactobacillus brevis*[J]. **Catalysis Science & Technology**, 2015, 5(8):4048-4054.
 - [17] RUCIGAJ A, KRAJNC M. Optimization of a crude deoxyribose-5-phosphate aldolase lysate-catalyzed process in synthesis of statin intermediates[J]. **Organic Process Research & Development**, 2013, 17(5):854-862.
 - [18] VAJDIC T, OSLAJ M, KOPITAR G, et al. Engineered, highly productive biosynthesis of artificial, lactonized statin side-chain building blocks: the hidden potential of *Escherichia coli* unleashed[J]. **Metabolic Engineering**, 2014, 24(1):160-172.
 - [19] JIAO X C, ZHANG Y J, CHEN Q, et al. A green-by-design system for efficient bio-oxidation of an unnatural hexapyranose into chiral lactone for building statin side-chains[J]. **Catalysis Science & Technology**, 2016, 6(19):7094-7100.
 - [20] JIAO X C, PAN J, KONG X D, et al. Protein engineering of aldolase LbDERA for enhanced activity toward real substrates with a high-throughput screening method coupled with an aldehyde dehydrogenase[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017, 482(1):159-163.
 - [21] 蔡伟. 他汀类药物手性中间体的生物催化工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.