

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(8):988-994; 4 August 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

微生物来源的 γ 内酰胺酶研究进展

王建军¹, 郑国钧², 吴胜^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(² 北京化工大学制药工程系, 北京 100029)

摘要: γ -内酰胺酶属于酰胺酶, 其中的 (+) γ -内酰胺酶能够高效率的动力学拆分外消旋体 γ -内酰胺, 获得光学纯的 (-) γ -内酰胺。光学纯的 (-) γ -内酰胺是制备抗病毒药物碳环核苷化合物的重要手性中间体。目前报道共有 7 个来源于微生物的 γ -内酰胺酶, 其中来源于 *Aureoacterium sp.* 的 (-) γ -内酰胺酶的晶体结构获得了解析。根据晶体结构推测的 (-) γ -内酰胺酶的催化机理与 α/β 水解酶超家族的催化机理是类似的。但是, 目前还没有 (+) γ -内酰胺酶的晶体结构模型的数据及机理的描述。 γ -内酰胺酶的研究方向主要包括 γ -内酰胺酶的蛋白质工程改造, 对不同对映体选择性的 γ -内酰胺酶的催化机理的阐述, 以及 γ -内酰胺酶在生物体内的功能研究。

关键词: γ -内酰胺酶; 硫磺矿硫化叶菌; 手性中间体; 催化机理

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-0988

1 γ -内酰胺酶相关研究的意义

γ -内酰胺酶 (EC 3.5.2.-) 是 20 世纪 90 年代初期发现的一种新型的酰胺酶 (EC 3.5.1.4)^[1]。此类酶由于能够催化酰胺类化合物 γ -内酰胺的酰胺键水解而被命名 (图 1-A, B)。从此类酶研究的发展轨迹来看, 人们是出于对光学纯的 (-) γ -内酰胺的需求而开启的 γ -内酰胺酶的相关研究^[2]。这是因为, 光学纯的 (-) γ -内酰胺是制备碳环核苷化合物的重要手性中间体^[3], 碳环核苷化合物是核苷类药物中最为重要的一类化合物, 核苷类药物占目前已上市和正在临床实验中的抗病毒药物中的绝大多数。 γ -内酰胺酶中的 (+) γ -内酰胺酶能够通过高效率的动力学拆分外消旋体 γ -内酰胺, 获得光学纯的 (-) γ -内酰胺^[4] (图 1-C)。

举例来说, 以 (-) γ -内酰胺为光学中间体, 可以合成抗艾滋病药物阿巴卡韦^[2-5] 和抗流感药物帕拉米韦^[6-8]。阿巴卡韦是治疗艾滋病和疱疹病毒感染的药物, 是“鸡尾酒疗法”中的重要药物组成成分。抗艾滋病药物是一个巨大的市场, 抗艾滋病药物的消耗, 包括阿巴卡韦的需求量和销售量目前都在逐年递增; 帕拉米韦是一种正在进行三期临床试验的治疗流感的药物。大家有目共睹的是, 近几年来流感疫情发生了数次全球性的爆发, 在这种形式下, 迫切需要开发利用高效, 低副作用的抗流感药物。而研究证明, 帕拉米韦在治疗禽流感方面比“达菲”的效果更明显^[9]。综上所述, 我们可以预见的是: 由于阿巴卡韦和帕拉米韦的需求量的不断增加, 作为重要手性原料的光学纯的 (-) γ -内酰胺的产量需求今后也会不断的提高。此外, γ -内酰胺酶还可以通过催化外消旋 γ -内酰胺获得不同构型的

基金项目: 中国科学院微生物研究所微生物资源前期国家重点实验室青年基金课题

* 通信作者。Tel./Fax: +86-10-64807417; E-mail: shengwu@im.ac.cn

作者简介: 王建军 (1972-), 新疆乌鲁木齐人, 博士, 助理研究员, 主要从事酶促生物转化的研究。E-mail: wangjj@im.ac.cn

收稿日期: 2010-03-01; **修回日期:** 2010-05-13

γ -氨基丁酸类似物 (GABA) [10]。GABA 是一种重要的抑制性神经递质, 它参与多种代谢活动, 具有很高

的生理活性 [11-12]。

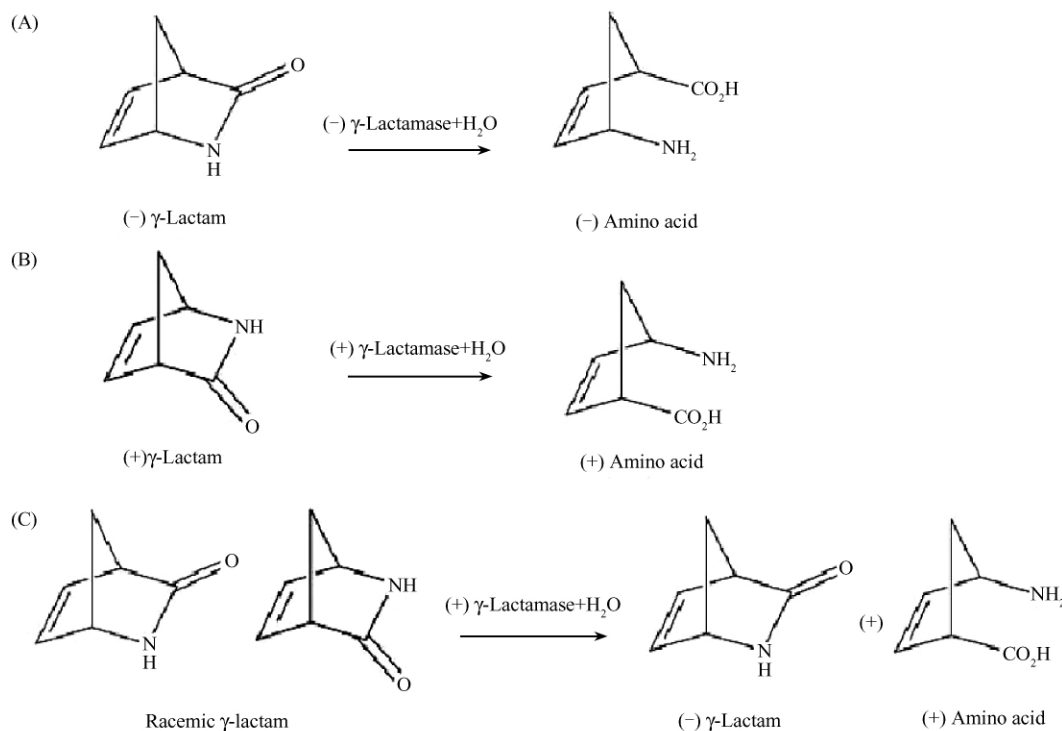


图 1 γ -内酰胺酶催化相应的底物水解生成氨基酸

Fig. 1 Hydrolysis of the γ -lactams catalysed by γ -lactamases to produce amino acids

应用具有自主知识产权的生物酶法, 工业化大规模生产 (-) γ -内酰胺, 可以解决目前以及今后国内医药企业在阿巴卡韦国产化过程中, 关键手性中间体短缺的问题。填补了国内 (-) γ -内酰胺生产技术的空白, 使阿巴卡韦的国产化变为可能。抗艾滋病药物的国产化可以极大地降低艾滋病治疗成本, 减轻社会负担, 具有极高的经济价值和社会价值。对于国家的疾病防治工作具有重要的意义。

除了应用科学方面的意义之外, 在酶催化的基础研究方面, 此类酶的研究结果也具有非常重要的科学意义。这是因为, 此类酶的个体一般具有多重的酶催化活性, 这些活性包括酰胺酶, 腈水解酶和卤过氧化物酶的活性 [13-14], 这种多重活力对于研究相关酶的催化机理之间的联系, 以及这些酶之间的进化关系具有非常重要的科学意义。

在发现 (+) γ -内酰胺酶之前, 文献报道的制备光学纯的 (-) γ -内酰胺一般采用不对称合成的方法。使用这种方法的缺点在于: 原料昂贵, 步骤烦琐, 成本较高, 不利于工业化生产 [15]。与此形成鲜明对比的是, 用 (+) γ -内酰胺酶进行催化合成光学纯的 (-) γ -内酰胺具有效率高, 产物纯度高及对环境友好的特点 [16-21]。

综上所述, 鉴于 (+) γ -内酰胺酶具有作为优良的工业催化剂的基本条件, 以及具有多重催化活性的特点, 对于该酶催化机制的研究可以阐明该酶的立体选择性和多重底物活力的机理; 在阐明催化机理的基础上, 可以为提高催化剂的催化性能的分子改造提供理论基础, 从而有助于获得具有自主知识产权的工业催化剂; 此外, 对于该酶催化机制的研究可还以为揭示其生理功能提供线索。

2 γ -内酰胺酶的相关研究的现状

γ -内酰胺酶 (EC 3. 5. 2. -) 属于酰胺酶的一种 (EC 3. 5. 1. 4), 所以, 我们首先有必要了解一些酰胺酶的相关背景。从底物催化的角度看, 酰胺酶是通过把底物分子的酰基转移给水分子形成游离酸和氨的方法来断裂碳-氮键。目前发现的酰胺酶可以作用的底物谱很广, 包括短链酰胺类化合物, 不饱和酰胺类化合物, 杂环酰胺类化合物, 脂肪酸酰胺类化合物和氨基酸类化合物 [10, 13, 15-17]。

根据一级结构的特征, 酰胺酶可以分成两大类。其中一类酰胺酶含有一个非常保守的 GGSS (S/G) GS 特征序列 (signature sequence), 这段特征序列一般位于蛋白中段的一段 130 个氨基酸的保守序列之

中。所以这类酰胺酶也被称作‘特征序列酰胺酶’(signature amidase)^[18-22]。另外一类酰胺酶的蛋白序列中不存在这个特征序列。此类无“特征序列”的酰胺酶来源很广泛,目前报道的微生物来源包括 *Pseudomonas aeruginosa*^[23], *Brevibacterium sp.*^[24], *Methylophilus methylotrophus*^[25], 和 *Helicobacter pylori*^[26]。而“特征序列”的酰胺酶来源相对单一^[18],目前报道的此类酰胺酶主要来源于古菌,包括 *Methanococcus jannaschi*^[19], *Archaeoglobus fulgidus*^[20], 和 *Pyrococcus horikoshi*^[21]。

γ -内酰胺酶虽然属于酰胺酶,但是它的相关研究起步较晚。这个研究方向最初的目的是利用生物转化方法,高效率的获得手性的(-) γ -内酰胺。从

九十年代初期开始,相关的研究者在做了大量的前期菌株及基因组的筛选工作以后,发现某些菌株的全细胞和一些从基因组文库中筛选到的基因的表达产物,能够立体选择性水解外消旋 γ -内酰胺,获得光学纯的(+) γ -内酰胺或者(-) γ -内酰胺^[1,3,27-28]。

到目前为止,文献报道的产 γ -内酰胺酶的菌株数量相对较少,我们仅检索到七个菌株具有 γ -内酰胺酶活力的报道(表1),这七个菌株分别是 *Rhodococcus sp.*^[2], *Pseudomonas solanacearum*^[2], *Pseudomonas fluorescens*^[1], *Aureobacterium sp.*^[1,14], *Comomonas acidovorans*^[28], *Sulfolobus solfataricus*^[27,29] 和 *Microbacterium hydrocarbonoxydans*^[16,30]。

表1 不同微生物来源的 γ -内酰胺酶的简介

Table 1 The γ -lactamases originated from microbes

No.	Reference	Strain	Catalysing style	Enantioselectivity	ee value/%	E value	Yield/%
1	2	<i>Rhodococcus equi</i> NCIB 40213	Whole cells	(-) γ -lactam	>98	-	45
2	2	<i>Pseudomonas solanacearum</i> NCIB 40249	Whole cells	(+) γ -lactam	>98	-	45
3	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Whole cells	(+) γ -lactam	93	94	-
4	1	<i>Aureobacterium sp.</i>	Whole cells	(-) γ -lactam	97	76	-
5	1,15	<i>Aureobacterium sp.</i>	Pure enzyme(31kDa)	(-) γ -lactam	99.9	>7000	-
6	29	<i>Comomonas acidovorans</i>	Pure enzyme(55kDa)	(+) γ -lactam	>98	>400	70
7	4,28	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Pure enzyme(55kDa)	(+) γ -lactam	99.9	98	-
8	17	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Whole cells	(+) γ -lactam	99.5	-	40
9	31	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Pure enzyme(31kDa)	(-) γ -lactam	93	9.5	-

The meaning of the E value see reference 31

其中, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas solanacearum*, *Comomonas acidovorans* 和 *Pseudomonas fluorescens* 来源的 γ -内酰胺酶的性质没有被表征,而仅仅是用全细胞进行了目标化合物的拆分转化。*Rhodococcus sp.* 来源的(-) γ -内酰胺酶在转化率达到45%的情况下,可以获得98%左右光学纯度的(+) γ -内酰胺,而 *Pseudomonas solanacearum* 来源的(+) γ -内酰胺酶在同样的转化率条件下^[2],也可以获得98%光学纯度的(-) γ -内酰胺^[2]。*Pseudomonas fluorescens* 来源的(+) γ -内酰胺酶在拆分外消旋 γ -内酰胺时,表征酶对映体选择性的E值可以达到94^[31]。

通过建立基因组文库,相关研究者获得了来源于 *Comomonas acidovorans* 的(+) γ -内酰胺酶基因,并且成功活性表达了此酶(55kDa)。重组酶在通过半制备纯化后进行转化实验,其底物耐受浓度可以达到500 g/L^[28]。此(+) γ -内酰胺酶的蛋白序列和来源于 *Mycobacterium smegmatis* 以及 *Methylophilus methylotrophus* 的乙酰胺酶的序列具有65%的相似性,乙酰胺酶一般以短链的酰胺类化合物作为底物。在后续的工作中,相关的研究者通过气相扩散的方

法,以 β -辛基葡萄糖苷作为沉淀剂获得了此酶的晶体,并且通过同步加速器辐射获得了分辨率为2.4Å的晶体数据^[33]。然而,可能是由于是全新的蛋白晶体结构使得后续的结构解析过程比较困难,此酶的晶体结构的解析结果到目前为止还没有发表。

另外,有三个菌株来源的 γ -内酰胺酶已经获得纯酶,它们包括来源于 *Aureobacterium sp.* 的(-) γ -内酰胺酶^[14],来源于 *Sulfolobus solfataricus* 的(+) γ -内酰胺酶^[29] 和来源于 *Microbacterium hydrocarbonoxydans* 的(+) γ -内酰胺酶^[16,30],下文将对这几个来源的酶做比较详尽的介绍。

来源于 *Microbacterium hydrocarbonoxydans* 的(+) γ -内酰胺酶的工作主要在本课题组完成。本课题组从2004年开始 γ -内酰胺酶的相关研究。我们从环境土壤中筛选到了一株能够产高活力的(+) γ -内酰胺酶的微杆菌^[16],通过离子交换色谱,疏水色谱以及体积排阻色谱等蛋白纯化方法纯化了此酶^[30]。根据纯化的蛋白的N端氨基酸序列,我们从此菌的基因组中获得了两个选择性相反的 γ -内酰胺酶,对这两个酶进行了纯化和性质研究。在这两个酶中,其中(-) γ -内酰

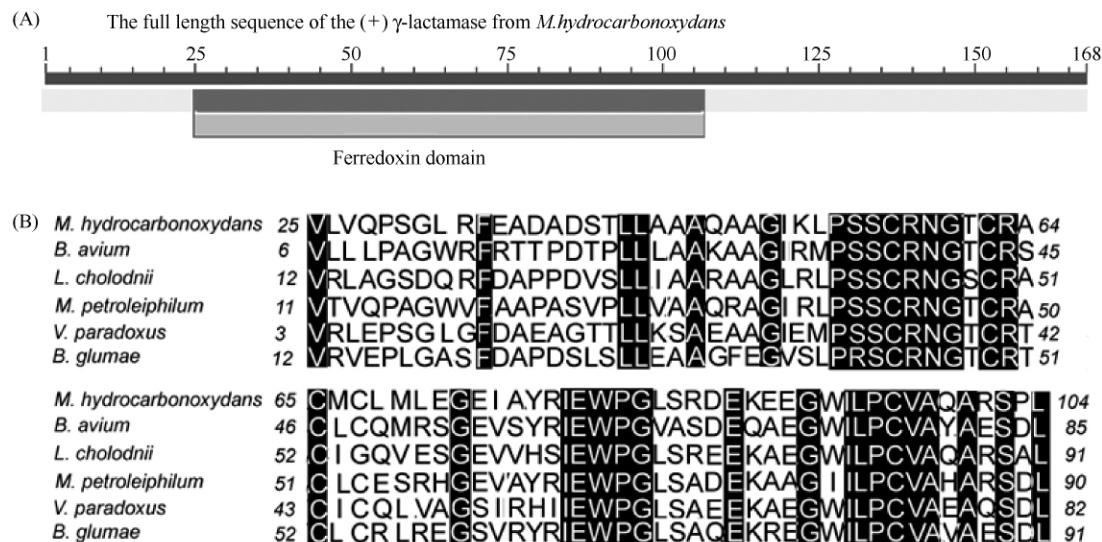


图 2 微杆菌 (+) γ -内酰胺酶的结构示意图 (A) 及 N 端铁氧还蛋白结构域与其他来源的铁氧还蛋白的氨基酸序列对比 (B)

Fig. 2 The scheme of the primary structure of the γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans* (A), and the alignment of the N terminal ferredoxin domain with ferredoxins from different origins (B). The scheme of the primary structure, the full length sequence of the γ -lactamase includes 168 amino acids, the ferredoxin domain is between the 25th and the 107th amino acids. B. Alignment with the ferredoxin from *B. avium* 197N (accession number: YP_786941), the ferredoxin from *L. cholodnii* SP-6 (accession number: YP_001791786), the ferredoxin from *B. glumae* (accession number: YP_002908290), the ferredoxin from *M. petroleiphilum* PM1 (accession number: YP_001020565), the ferredoxin from *V. paradoxus* S110 (accession number: YP_002945535).

胺酶和来源于 *Aureoacterium sp.* 的 (-) γ -内酰胺酶具有 90% 相似性^[14], 另外一个 (+) γ -内酰胺酶具有非常特殊的一级结构, 它是一个和铁氧还蛋白融合的酶 (图 2), 这在之前所报道的酰胺酶中是绝无仅有的, 因此我们推测, 此酶很可能具有新的催化机理。目前相关的研究工作正在进行中。

来源于 *Aureoacterium sp.* 的 (-) γ -内酰胺酶是研究的比较透彻的一个 γ -内酰胺酶。此酶的蛋白序列与来源于 *Streptomyces aureofaciens* 的无辅因子卤过氧化物酶具有 68% 的相似性。无辅因子卤过氧化物酶与含铁和含钒的卤过氧化物酶同属于卤过氧化物酶家族 (EC 1. 11. 1. 10)。无辅因子卤过氧化物酶只有在有机酸, 例如乙酸存在的情况下才具有卤过氧化物酶的活力。

由于获得了酶晶体结构以及酶和底物的复合物晶体结构, 来源于 *Aureoacterium sp.* 的 (-) γ -内酰胺酶的工作主要解决了此类酶的催化机理问题。从目前所获得的研究数据来看, γ -内酰胺酶的催化机理与 α/β 水解酶超家族的催化机理是类似的^[14]。以来源于 *Aureoacterium sp.* 的 (-) γ -内酰胺酶为例, 这个过程可以简单概括如下 (示意图可以参见文献 14): 首先, 底物分子的羰基氧原子与酶的几个特定氨基酸残基形成的呈正电性的氧洞结合, 从而被

“活化”, 酶活性中心的丝氨酸残基被组氨酸残基去质子化, 然后去质子化后的丝氨酸攻击活化的氧原子, 形成一个四面体结构的中间体, 获得质子的组氨酸残基将质子传递给底物分子中的氮原子, 之后四面体的中间体解体, 形成酰基化的酶, 一个被活性中心组氨酸残基去质子化的水分子攻击酰基酶复合物从而形成第二个四面体中间体, 最后, 活性中心的丝氨酸残基接受组氨酸残基的质子, 同时第二个中间体解体生成产物 γ -氨基丁酸的类似物。

但是, 由于 γ -内酰胺在生物体内并不存在, 是一种非“天然”的酶底物, 所以到现在为止, 有关 γ -内酰胺酶的催化机理的研究成果还相对较少。如前文所述, 目前仅有来源于 *Aureoacterium sp.* 的 (-) γ -内酰胺酶的晶体结构获得了解析^[14], 据此结构研究者提出了相应的 (-) γ -内酰胺酶的催化机理。但是, 由于此酶的催化拆分产物 (+) γ -内酰胺实际上没有太大的应用价值, 所以此项工作的成果虽然具有较高的理论意义, 对于 (-) γ -内酰胺的合成应用没有显著的贡献。此外, 有关研究者通过悬滴法获得了来源于 *S. solfataricus* 的 (+) γ -内酰胺酶晶体, 并且通过低温同步辐射收集了晶体数据^[33], 可能是晶体数据质量的原因, 此酶的结构模型到目前为止还没有公布。因此, (+) γ -内酰胺酶的立体选择

性催化机理的研究目前还是空白。

最新的有关 γ -内酰胺酶的文献描述了 γ -内酰胺酶在微反应器中的应用^[34]。作者把来源于 *Sulfolobus solfataricus* 的 γ -内酰胺酶与介质交联后,固定化在毛细管中形成一个微反应器,在比较了游离酶和微反应器中固定化酶的催化参数后发现,固定化酶的对大多数底物的活力降低,但是稳定性有所提高。由于微反应器的体积很小,所以这个系统在酶底物的筛选应用中具有较高的实用意义^[34]。

3 *Sulfolobus solfataricus* (+) γ -内酰胺酶的研究现状

在目前已发现的 γ -内酰胺酶中,来源于 *S. solfataricus* 的 (+) γ -内酰胺酶具有很强的代表性。作为一种“特征序列酰胺酶”,此酶来源于超高温古菌,决定了其具有超强的稳定性,因此具有易于纯化的性质。更难能可贵的是,此酶是所有能进行动力学拆分的酶中,为数极少的具有绝对选择性的几个酶之一。也就是说,在拆分外消旋的 γ -内酰胺时,此酶仅仅作用于其中一个光学对映体 (+) γ -内酰胺^[27],所以本文对此酶做一些重点的介绍。

S. solfataricus 的 γ -内酰胺酶具有一些很特殊的性质,例如,这个酶在 pH 值和温度变化时寡聚状态会发生相应的变化^[35]。在催化性质上,这个酶也具有比较独特的性质。具体来说,这个酶除了具有对 γ -内酰胺水解的活力外,还具有脲水解酶的活力^[36]。此酶的脲水解酶活力来源于半胱氨酸,顺式丝氨酸和赖氨酸 (Cys145, cisSer171 和 Lys96) 组成的活性中心,这种双重活力是根据同源建模和定点突变的结果证明的^[36]。需要强调的是,这个酶的 γ -内酰胺水解活力活性中心是由另外的一个丝氨酸 (Ser195),外加脲水解酶活性中心中的顺式丝氨酸和赖氨酸 (cisSer171 和 Lys96) 构成的,除了构成活性中心的三个氨基酸之外,活性中心附近的三个氨基酸 (Arg197, Lys209 和 Asp228) 对于酰胺酶功能的实现也有重要的作用^[36-37]。

S. solfataricus 的 γ -内酰胺酶这种具有双重活力的特性,对于研究酰胺酶和脲水解酶的催化机理之间的联系,以及这两个酶之间的进化关系具有非常重要的意义。

4 γ -内酰胺酶相关研究的发展动态

由于 (+) γ -内酰胺酶在合成碳环核苷化合物中的重要角色,所以从应用科学的角度来看,今后工

作的主要方向仍旧是寻找高效率,高稳定性的适于工业化生产的 (+) γ -内酰胺酶;对现有酶进行蛋白质工程改造以提高催化效率;开发应用拆分反应的副产物 γ -氨基丁酸;从基础科学的角度看,今后的工作重点将是对不同对映体选择性的 γ -内酰胺酶的催化机理的阐述,特别是 (+) γ -内酰胺酶催化的绝对立体选择性的机理。此外,如前文所述,由于 γ -内酰胺是一种非天然的化合物, γ -内酰胺酶在生物体的天然底物目前还未知,因此 γ -内酰胺酶在生物体内的功能研究也将是今后研究的一个重点。

参考文献

- [1] Taylor SJC, McCague R, Wisdom R, Leea C, Dicksona K, Ruecrofta G, O'Briena F, Littlechild J, Bevana J, Roberts SM, Evansa CT. Development of the biocatalytic resolution of 2-azabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-3-one as an entry to single enantiomer carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron Asymmetry*, 1993, 4 (6): 1117-1128.
- [2] Taylor SJC, Sutherland AG, Lee C, Wisdom R, Thomas S, Roberts SM, Evans C. Chemoenzymatic synthesis of (-)-carbovir utilizing a whole cell catalysed resolution of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1990, 16: 1120-1121.
- [3] Brabban AD, Littlechild JA, Wisdom R. Stereospecific gamma-lactamase activity on *Pseudomonas fluorescens* species. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 16: 8-14.
- [4] Toogood HS, Brown RC, Line K, Keene PA, Taylor SJC, McCague R, Littlechild JA. The use of a thermostable signature amidase in the resolution of the bicyclic synthon (rac)-lactam. *Tetrahedron*, 2004, 60 (3): 711-716.
- [5] Vince R, Hua M. Synthesis of anti-HIV activity of carbocyclic 2', 3'-didehydro-2', 3'-dideoxy-2, 6-disubstituted purine nucleosides. *Journal of medicinal chemistry*, 1990, 33(1): 17-21.
- [6] Chand P, Kotian PL, Dehghani A, El-Kattan Y, Lin TH, Hutchison TL, Babu YS, Bantia S, Elliott AJ, Montgomery JA. Systematic structure-based design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent antiinfluenza activity. *Journal of medicinal chemistry*, 2001, 44(25): 4379-4392.
- [7] Chavas LM, Kato R, Suzuki N, von Itzstein M, Mann MC, Thomson RJ, Dyason JC, McKimm-Breschkin J, Fusi P, Tringali C, Venerando B, Tettamanti G, Monti E, Wakatsuki S. Complexity in Influenza Virus Targeted Drug Design: Interaction with Human Sialidases. *Journal of medicinal chemistry*, 2010, DOI: 10.1021/jm100078r

- [8] Lagoja IM, De Clercq E. Med Res Rev. Anti-influenza virus agents: synthesis and mode of action. *Medicinal Research Reviews*, 2008, 28(1):1-38.
- [9] Bania S, Parker CD, Ananth SL. Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ2270201 with those of Oseltamivir and Zanamivir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, 45 (4):1162-1167.
- [10] Allan, R D, Fong J. Synthesis of analogues of GABA. XV preparation and resolution of some potent cyclopentene and cyclopentane derivatives. *Australian journal of chemistry*, 1986, 39(6): 855-864.
- [11] Bhat R, Axtell R, Mitra A, Miranda M, Lock C, Tsien RW, Steinman L. Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(6):2580-2585.
- [12] Renault H, Roussel V, El Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, Deleu C. The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:20.
- [13] Giordano C, Ammendola S. Characterization of mutants of *Sulfolobus solfataricus* signature amidase able to hydrolyse R-ketoprofen amide. *Protein and Peptide Letters*, 2008, 15(6):617-623.
- [14] Line K, Isupov M, Littlechild JA. The crystal structure of a (-) gamma-lactamase from an *Aureobacterium* species reveals a tetrahedral intermediate in the active site. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 338(3):519-532.
- [15] Velazquez F., Olivo HF. The application of chiral oxazolidinethiones and thiazolidine-thioned in asymmetric synthesis. *Current Organic Chemistry*, 2002, 6 (4): 303-340.
- [16] 李海泉, 苏磊, 王建军, 郑国钧. 产 γ -内酰胺水解酶菌株的筛选及发酵条件研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46 (4): 571-575.
- [17] Hashimoto Y, Nishiyama M, Ikehata O, Horinouchi S, Beppu T. Cloning and characterization of an amidase gene from *Rhodococcus* species N-774 and its expression in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1088 (2): 225-233.
- [18] Mayaux JF, Cerbelaud E, Soubrier F, Yeh P, Blanche F, Pétré D. Purification, cloning, and primary structure of new enantioselective amidase from *Rhodococcus* strain: structural evidence for a conserved genetic coupling with nitrile hydratase. *Journal of bacteriology*, 1991, 173 (21):6694-6704.
- [19] Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1996; 273 (5278):1058-1073.
- [20] Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Peterson S, Reich CI, McNeil LK, Badger JH, Glodek A, Zhou L, Overbeek R, Gocayne JD, Weidman JF, McDonald L, Utterback T, Cotton MD, Spriggs T, Artiaich P, Kaine BP, Sykes SM, Sadow PW, D'Andrea KP, Bowman C, Fujii C, Garland SA, Mason TM, Olsen GJ, Fraser CM, Smith HO, Woese CR, Venter JC. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 1997, 390 (394):364-370.
- [21] Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Haikawa Y, Hino Y, Yamamoto S, Sekine M, Baba S, Kosugi H, Hosoyama A, Nagai Y, Sakai M, Ogura K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Ohfuku Y, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Kikuchi H. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA research*, 1998, 5(2):55-76.
- [22] Ohtaki A, Murata K, Sato Y, Noguchi K, Miyatake H, Dohmae N, Yamada K, Yohda M, Odaka M. Structure and characterization of amidase from *Rhodococcus* sp. N-771: Insight into the molecular mechanism of substrate recognition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1804 (1):184-192
- [23] Kobayashi M, Nagasawa T, Yamada H. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. *Trends in biotechnology*, 1992, 10(11): 402-408.
- [24] Valle F, Balba P, Merino E, Bolivar F. The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16(1): 36-40.
- [25] Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 1996, 384 (6604):83-87.
- [26] Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, 1997, 25 (5): 989-998.
- [27] Toogood HS. Brown RC. Line KK, Phil A, Taylor SJC, McCague R, Littlechild JA. The use of a thermostable signature amidase in the resolution of the bicyclic synthon (rac)-lactam. *Tetrahedron*, 2004, 60(3): 711-716.
- [28] Taylor SJ, Brown RC, Keene PA, Taylor IN. Novel screening methods-the key to cloning commercially

- successful biocatalysts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, 7(10): 2163-2168.
- [29] Wang JJ, Zhang X, Min C, Wang JY, Zheng GJ. Single-step purification and immobilization of γ -lactamase and on-column transformation of 2-azabicyclo [2.2.1] hept-5-en-3-one. *Process Biochemistry*, 2010, accepted.
- [30] Wang JJ, Guo XY, Zheng GJ, Wen C. Purification and characterization of a novel (?) γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(2): 345-348.
- [31] Chen CS, Wu SH, Girdaukas GS, Sih CJ. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, 1982, 104(25): 7294-7299.
- [32] Gonsalvez IS, Isupov MN, Littlechild JA. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a gamma-lactamase. *Acta Crystallographica D Biology Crystallographica*, 2001, 57(2):284-286.
- [33] Nastopoulos V, Vallone B, Politi L, Scotto D' Abusco A, Scandurra R, Tsernoglou D. Crystallization and X-ray diffraction measurements of a thermophilic archaeal recombinant amidase from *Sulfolobus solfataricus* MT4. *Acta Crystallographica D Biology Crystallographica*, 2001, 57(7): 1036-1037.
- [34] Hickey AM, Ngamsom B, Wiles C, Greenway GM, Watts P, Littlechild JA. A microreactor for the study of biotransformations by a cross-linked gamma-lactamase enzyme. *Biotechnology journal*, 2009, 4(4):510-516.
- [35] D' Abusco AS, Casadio R, Tasco G, Giangiacomo L, Giartosio A, Calamia V, Di Marco S, Chiaraluce R, Consalvi V, Scandurra R, Politi L. Oligomerization of *Sulfolobus solfataricus* signature amidase is promoted by acidic pH and high temperature. *Archaea*, 2005, 1(6): 411-423.
- [36] Cilia E, Fabbri A, Uriani M, Scialdone GG, Ammendola S. The signature amidase from *Sulfolobus solfataricus* belongs to the CX3C subgroup of enzymes cleaving both amides and nitriles. Ser195 and Cys145 are predicted to be the active site nucleophiles. *FEBS journal*, 2005,272(18): 4716-4724.
- [37] Elisa C, Sergio A. Identification of the amino acid residues affecting the catalytic pocket of the *Sulfolobus solfataricus* signature amidase. *Protein and Peptide Letters*, 2010, 17(2):146-150.

Advances in lactamases from microbes-A review

Jianjun Wang¹, Guojun Zheng², Sheng Wu^{1*}

(¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(²Department of Pharmaceutical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: γ -Lactamase belongs to the amidase. The (+) γ -lactamses can be applied in the kinetic resolution of racemic γ -lactam, which can produce (-) γ -lactam efficiently. The (-) γ -lactam enantiomer is an important synthon for the synthesis of carbocyclic nucleosides. Up to now seven strains of microbes were reported that produced γ -lactamses. The crystal structure of (-) lactamase from *Aureoacterium sp.* was resolved, and the catalytic mechanism based on the structure data analysis was alike with the α/β hydrolase family. However, no structure data and mechanism theory is available for (+) lactamase till now. The future works focus on protein engineering of the γ -lactamase to improve the catalysis of the protein, elucidation of the catalytic mechanism of the γ -lactamase and the functions of the γ -lactamase *in vivo*.

Keywords: γ -Lactamase; *Sulfolobus solfataricus*; chiral intermidates; catalytic mechanism

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Youth Fund of State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807417; E-mail: shengwu@im.ac.cn

Received :1 March 2010/Revised: 13 May 2010