

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-059

醇脱氢酶的研究进展及其催化增值生物基呋喃化合物前景展望

刘庠诗¹, 吴奕禄¹, 詹鹏¹, 黄天灏², 蔡的¹, 秦培勇²(¹ 北京化工大学, 国家能源生物炼制研发中心, 北京 100029; ² 北京化工大学, 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 广泛存在于生物体内, 可应用于多种有机物选择性氧化还原。近年来, 随着对酶的催化机理、结构认知、分子改造和反应系统构建及强化等方面研究的逐渐深入, ADH在生物基平台化合物的高选择性催化氧化还原方面展现出巨大潜力。本文综述了ADH分子设计和定向改造的前沿技术和进展, 面向常见的辅因子依赖性ADH催化过程中的辅因子高成本及稳定性差等局限, 聚焦酶反应过程中的辅因子再生强化技术, 梳理了适用于ADH催化系统的化学驱动、酶驱动和光电驱动辅因子再生路径, 并从单酶催化体系开发、多酶协同催化系统挖掘、全细胞催化技术发展与应用等多个角度概述了ADH在催化生物基呋喃化合物方向的最新研究进展。随着对ADH应用潜力的进一步挖掘, 未来ADH有望成为生物基呋喃增值工业化进程中的重要组成部分, 为能源生产的绿色发展提供助力。

关键词: 醇脱氢酶; 呋喃类化合物; 氧化还原反应; 辅因子再生; 生物质增值

中图分类号: Q554+.1 文献标志码: A

State-of-the-art for alcohol dehydrogenase development and the prospect of its applications in bio-based furan compounds valorization

LIU Xiangshi¹, WU Yilu¹, ZHAN Peng¹, HUANG Tianhao², CAI Di¹, QIN Peiyong²(¹National Energy R&D Center for Biorefinery, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; ²Collage of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Alcohol dehydrogenase (ADH) is found widely in living cells, where it catalyzes the oxidation or reduction between hydroxyl group and carbonyl group. It also catalyzes redox reactions of a variety of organic compounds with high selectivity. In recent years, with the research progress of the catalytic mechanism, structural information, molecular modification, and reaction systems, ADH has shown great promise in the highly selective catalysis of various bio-based platform compounds. One example is the oxidation or reduction of furan derivatives such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which are important sustainable building blocks for bio-jet fuels and biomaterials that are derived from tandem hydrolysis, isomerization, and dehydration of hemicelluloses and

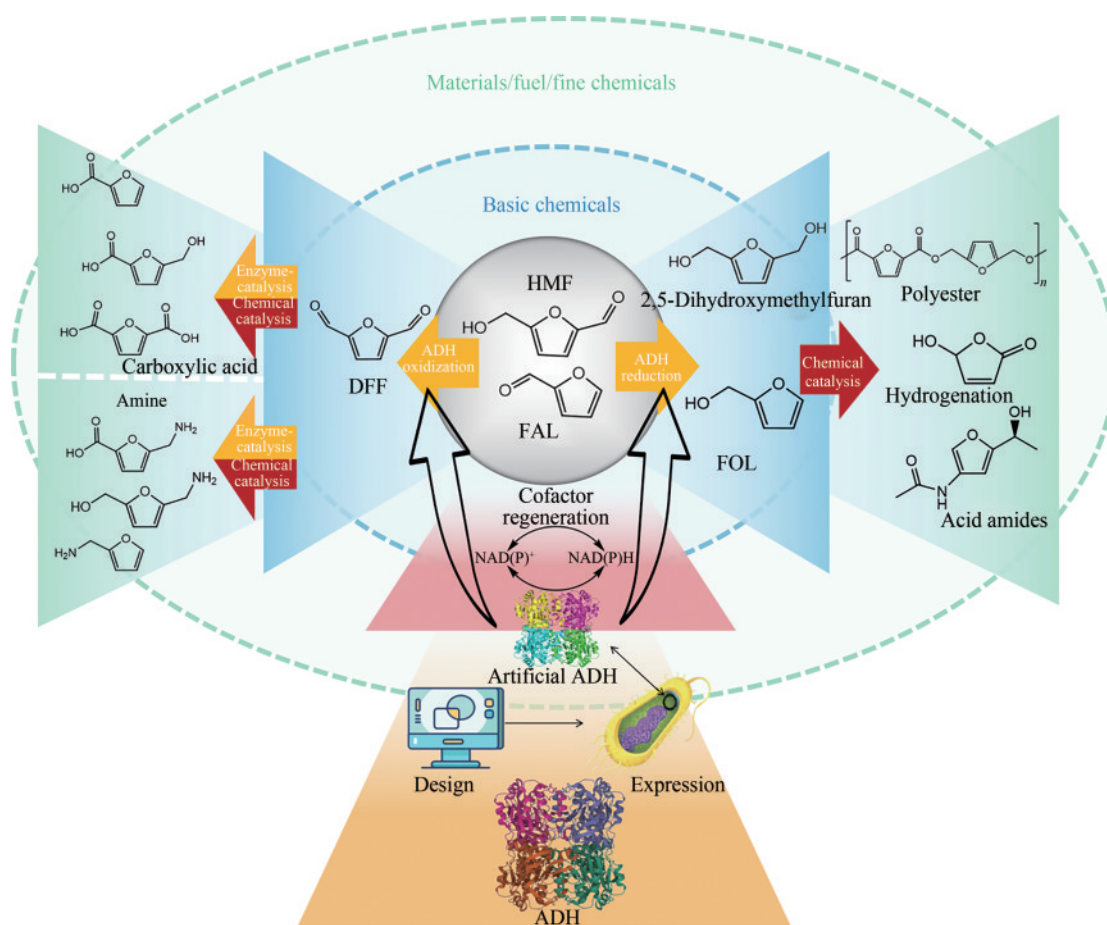
收稿日期: 2023-08-21 修回日期: 2023-10-17

基金项目: 国家自然科学基金 (22078018); 北京自然科学基金 (2222016)

引用本文: 刘庠诗, 吴奕禄, 詹鹏, 黄天灏, 蔡的, 秦培勇. 醇脱氢酶的研究进展及其催化增值生物基呋喃化合物前景展望[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1122-1139

Citation: LIU Xiangshi, WU Yilu, ZHAN Peng, HUANG Tianhao, CAI Di, QIN Peiyong. State-of-the-art for alcohol dehydrogenase development and the prospect of its applications in bio-based furan compounds valorization[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1122-1139

celluloses fractions in lignocellulose matrixes. This review focuses on the cutting-edge technologies in molecular design and directional engineering of ADH. In addition, the intensification of cofactor regeneration processes, including chemical-driven, enzyme-driven, and photo/electricity-driven pathways were also summarized. These methods could be the solutions to the negative aspects, such as expensive cost, poor stability, and the poor circulating efficiency of the nicotinamide cofactors that are indispensable assisted in typical ADH catalysis process. Moreover, the latest research progresses of ADH in catalysis of bio-based furans platform chemicals were also discussed. Apart from using ADH solely for the activation of the hydroxyl and carbonyl groups in the biobased furan derivatives and the production of oxidative and reductive products, there is also of great promise in cascade ADH catalysis and other chemical or biological catalysis processes in one-pot under relatively mild conditions to valorize the furan derivatives into valuable fine chemicals. Meanwhile, the whole-cell catalytic process that involves ADH and *in vivo* cofactors regeneration also possesses potentials in biobased furans valorization, with the advantages of low catalyst loading and processing costs. Overall, the researches of ADH in catalysis biological furans valorization has entered a new stage. With the further exploration of the potential applications of ADH, its role in the transformation of biomass resources will be increasingly important, particularly in the industrial process in the future.



Keywords: alcohol dehydrogenase; furan compounds; oxidation-reduction reaction; cofactor regeneration; biomass valorization

醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 广泛存在于多种生物的细胞中, 是生物体内最重要的氧化还原催化剂之一, 主要用于催化生命体内的脂肪、糖类、氨基酸、激素、辅因子等的氧化还原代谢^[1]。近年来, 随着对该类酶催化机制的理解逐渐深入, 基于ADH的催化氧化还原反应因广谱性、绿色性、高立体选择性等优势, ADH在医药、农药、食品等绿色生物制造领域均有重要的应用^[2-7]。

作为一种辅因子依赖型氧化还原酶, ADH需要辅因子参与并作为质子转移媒介催化醇与醛/酮化合物之间的转化^[8-12]。根据辅因子的差异, ADH可大体分为烟酰胺类辅因子依赖型、黄素腺嘌呤二核苷酸依赖型、吡咯-喹啉奎宁依赖型等^[13]。目前已知的ADH多为NAD(P)⁺依赖型酶, 该类酶亦可进一步分为短链不含Zn²⁺、中链含Zn²⁺、长链含Fe²⁺等亚类^[14]。

由于烟酰胺类辅因子如NAD(P)⁺等的生物提取和化学合成难度较大, 导致辅因子价格昂贵^[15], 因此需要在ADH催化氧化还原过程中重点考虑辅因子再生系统的构建, 以驱动电子/质子有效传递进而驱动反应进行^[16]。面向ADH催化过程中的辅因子再生, 现有技术路径主要有化学驱动、酶驱动、光电驱动等模式。其中, 化学驱动模式主要利用有机/无机催化剂的催化作用, 将底物中牺牲剂或第二底物氧化还原产生的电子或质子传递到辅因子上, 并驱动氧化型和还原型辅因子的反向反应, 恢复辅因子氧化/还原形式, 进而重新用于ADH的催化反应^[17]。酶驱动模式与化学驱动基本相同, 区别在于使用酶作为催化剂代替化学催化剂进行电子或质子的传递^[18]。在光电驱动辅因子再生过程中, ADH催化过程产生的电子或质子经辅因子传递给介体, 进而传递到电极或光敏材料表面。在外源电场或光照射情况下, 驱动反应过程中的辅因子再生^[19]。

近年来, 随着对酶催化机制、酶结构认知和分子改造、反应系统构建及强化等方面研究的逐渐深入, ADH在生物基平台化合物的高选择性生物催化氧化还原升级方面潜力巨大^[13, 20]。除应用于乙醇、丁醇等生物基醇类化合物的选择性氧化外^[21], ADH在生物基呋喃平台构筑, 如糠醛 (furfural,

FAL)、5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, HMF) 等分子的催化升级方面的研究亦逐渐深入^[22]。不同于需要贵金属催化剂、强酸碱或溶剂介质的热光电等化学路线, ADH可在温和、近似中性的水相体系中完成呋喃衍生物中的醛基和羟基的高选择性活化, 并易于与上下游的生物/化学催化过程耦合, 制备多种生物基燃料、材料前体和精细化学品^[13]。

本文系统梳理了ADH酶方向的研究进展, 包括ADH分子设计和改造, 辅因子再生强化技术等。并结合在绿色途径下生物基化学品的生物催化增值研究趋势, 重点讨论了基于ADH的生物基呋喃化合物催化系统的构筑路径和发展前景。

1 醇脱氢酶的定向改造

从自然界的微生物中异源获取的新酶往往需要经过定向进化或合理修饰方能够适用于工业化生产。自20世纪90年代以来, 酶的适应性进化技术 (ALE) 的发展和應用促进了工业酶分子设计和改造水平的提升^[23], 而宏基因组文库以及基因组技术的拓展和创新加速了新酶创制进程^[24]。目前, 对工业酶的分子改造多采用定点突变技术, 该技术主要有两类方法: ①根据蛋白质的氨基酸序列进行随机突变并定向筛选, 以获得催化性能提升的突变体; ②根据蛋白质三维结构和催化机制, 通过分析计算模拟选取拟改造活性位点并构建突变体来提高酶的性能^[25]。近年来, 随着相关算法的迭代, 计算机的算力提升, 以及结构生物学技术的发展, 酶分子的改造效率和精度提升显著, 已报道多类更高活性、更强环境适应力的工业酶制剂^[26-27]。

现有的针对ADH分子定向改造的研究报道多以定点突变为基础, 分为设计与合成两部分 (图1)。即通过多种计算工具的协同应用, 基于蛋白质序列从保守性、结构能量值等角度筛选可能存在的突变位点, 随后针对突变位点附近氨基酸特性利用计算机辅助理性设计, 同时预测新型蛋白质结构。随后基于蛋白质结构与氨基酸的对应关系推测出新的ADH的一级结构, 并按照中心法则得到新的基因序列, 以优化ADH的功能。近年

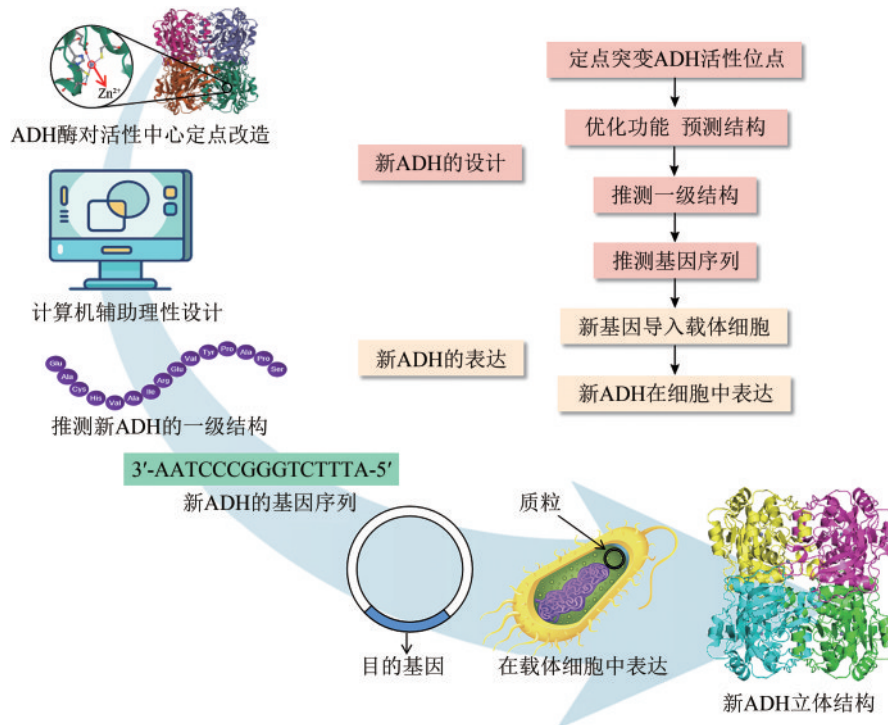


图1 ADH定向改造流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of ADH engineering process

来对ADH分子改造的研究重点围绕于酶分子催化活性、底物适用性、环境适应性、对映体选择性、辅因子适配性等方面展开(表1)。

在酶分子催化活性方面, Xu等^[28]利用了PROSS算法对来自*Clostridium beijerinckii*的ADH(*CbADH*)进行改造, 引进了Ser24Pro、Gly182Ala、Gly196Ala、His222Asp、Ser250Glu和Ser254Arg六个突变得到突变体*CbADH*-6M。该突变体表现出良好的可溶性和相比于野生型提高了16倍的高表达活性(46.3 U/mL)。为拓展ADH催化的底物适用范围, Musa等^[29]通过将来自热厌氧杆菌I86A(*Thermoanaerobacter ethanolicus* I86A)的ADH(*TeSADH*)活性位点附近氨基酸残基Ile86进行单点突变, 在大肠杆菌HB101(*Escherichia coli* HB101)中进行异源表达。新酶的底物结合域扩大, 实现苜基和杂芳基酮等较大底物的不对称还原; Ziegelmann-Fjeld等^[30]对来自热厌氧杆菌39E(*Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E)的ADH(*TeSADH*) Trp110残基进行突变, 使其在*Escherichia coli*进行表达, 新酶能够将*S*-1-苜基-2-丙醇, *S*-4-苜基-2-丁醇和相应的酮作为底物进行催化。

在ADH的环境适应性改造方面, 现有研究多集中在提升ADH的热稳定性和底物/产物耐受性方面。例如, Fiorentino等^[31]将来自*Bacillus stearothermophilus* LLD-R的ADH的Glu11和Pro242残基进行分别突变和同时突变, 在菌株*Escherichia coli* RB791中进行异源表达, 得到的3种新酶催化活性不受影响而耐热性明显提升。Ziegelmann-Fjeld等^[30]仅通过诱导来自热厌氧杆菌39E的ADH(*TeSADH*)的Trp110残基突变, 测得突变酶的热稳定性显著提升。Goihberg等^[38]将来自*Thermoanaerobacter brockii*的ADH(*TbADH*)、来自*Clostridium beijerinckii*的ADH(*CbADH*)与来自*Entamoeba histolytica*的ADH(*EhADH1*)三种ADH的辅因子结合结构域进行互换得到多种ADH嵌合体。之后, 进一步将来源于*Entamoeba histolytica*的ADH中Asp275替换为Pro, 由*Escherichia coli* TG-1表达, 结果证明*EhADH1*编码ADH的热稳定性显著提升^[32]。此外, 在ADH催化生物基呋喃化合物方向, 目前的研究多集中在酶的底物耐受性提升上。例如, Wu等^[33]在BLAST搜索的基础上使用*Synechocystis* sp. PCC 6803的ADH(*SynADH*)

表1 ADH分子设计与改造研究进展

Table 1 Current advances in ADH modification and expression

酶的来源	底盘菌株	改造方法	改造结果	参考文献
<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Escherichia coli</i>	利用 PROSS 对来源于 <i>Clostridium beijerinckii</i> 的乙醇脱氢酶基因中 Ser24Pro、Gly182Ala、Gly196Ala、His222Asp、Ser250Glu 和 Ser254Arg 六个位点进行定点诱变	催化活性增大到野生型 9 倍	[28]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	<i>Escherichia coli</i>	使用两步 PCR 法对来源于 <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 的乙醇脱氢酶基因中 Ile86Ala 等底物结合位点附近残基进行定点诱变	底物结合活性位点增大	[29]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	<i>Escherichia coli</i>	通过 PCR 技术对来源于 <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E 的乙醇脱氢酶基因的 Trp110Ala 残基发生定点突变, 并在 <i>Escherichia coli</i> 中过表达	ADH 的活性位点增大 提升对映体选择性 热稳定性提升	[30]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	定点诱变来源于 <i>Bacillus stearothermophilus</i> LLD-R 的乙醇脱氢酶基因的 Glu11Lys/Pro242Ala 残基, 并在 <i>Escherichia coli</i> 中过表达	重组菌株 ADH 表达量增加 该 ADH 耐热性进一步提升	[31]
<i>Thermoanaerobacter brockii</i>	<i>Escherichia coli</i>	定点诱变来源于 <i>Thermoanaerobacter brockii</i> 的乙醇脱氢酶基因的 Asp275Pro 残基, 并在 <i>Escherichia coli</i> 过表达	提高 ADH 分子的热稳定性	[32]
<i>Escherichia coli</i> BL21 (ED3)	<i>Escherichia coli</i>	使 <i>Escherichia coli</i> 共表达 GDH 与 <i>EcYjgB</i>	重组菌株 HMF 耐受性提升 HMF 到 BHMF 催化效率提升	[33]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	—	定点诱变来源于 <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 的乙醇脱氢酶基因的 Ser39Tyr 和 Cys295Ala 两个残基	对映体选择性提高	[34]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>Escherichia coli</i>	定点诱变来源于 <i>Pyrococcus furiosus</i> 的乙醇脱氢酶基因的 Lys249Gly/His255Arg 两个残基, 并在 <i>Escherichia coli</i> 中过表达	ADH 由 NADH 依赖性变为多种辅因子依赖型	[35]
<i>Deinococcus geothermalis</i>	—	定点诱变来源于 <i>Deinococcus geothermalis</i> 的乙醇脱氢酶基因的 Asp55Asn 等位于辅因子结合位点的残基	ADH 由 NADH 依赖型变成 NADPH 依赖型	[36]
<i>Rana perezi</i>	—	定点诱变来源于 <i>Rana perezi</i> 的乙醇脱氢酶基因的 Gly223Asp/Thr224Ile/His225Asn 三个连续残基	ADH 由 NADPH 依赖型变成 NADH 依赖型	[37]

作为探针进行 ADH 筛选, 获得了能够耐受 1 mol/L HMF 的 *EcYjgB*。之后, 使用大肠杆菌共表达葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 与咪喃耐受性 *EcYjgB*, 显著提升了 NADH 的再生效率和 HMF 还原产 2,5-咪喃二甲醇 [2,5-bis(hydroxymethyl) furan, BHMF] 转化率。

通过 ADH 活性位点的改造可显著提升产物的对映体选择性。例如, Ziegelmann-Fjeld 等^[30] 诱发 *TeSADH* 的 Trp110 残基突变, 使得突变体能够将 97% 以上的 1-苯基-1,3-丁二酮、苯氧基-2-丙酮和 1-(4-甲氧基苯基)-2-丙酮等转化为相应的 *S*-醇, 选择性大于 99%。Phillips 等^[34] 对来自 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的 ADH (*SADH*) 进行突变, 两种突变体 *S39T* 和 *C295A* 相比野生型 ADH 在 *R*-醇 (如 *R*-2-戊醇等) 立体特异性方面得到了极大的提升。此外, 辅因子再生为大多 ADH 酶促反应的限速步骤^[39], 通过改造拓宽辅因子种类以提高酶催化的动力学活性是

目前 ADH 及催化系统研究的另一热点^[35-37]。例如 Thompson 等^[40] 通过突变来自 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 的 ADH (*TeSADH*) 的 G244、N245、I248 残基, 将 *TeSADH* 由 NADPH 依赖型转变为 NADH 依赖型, 从而将 *TeSADH* 催化的反应与转氨酶催化的反应组成级联反应, 强化胺类制备。

2 辅因子再生系统

如前所述, 目前研究较为广泛的 ADH 多为 NAD(P)⁺ 依赖型酶。然而, 由于辅因子存在价格高、热稳定性差、对酸碱环境敏感等局限, 导致相关酶催化过程的实际应用受限^[41]。就生物基咪喃化合物的氧化还原反应而言, 由于 HMF、FAL 等底物均需要通过对生物质原料中的聚糖进行水解、异构化、脱水等多步反应获得, 该类底物的

上游制备过程往往存在成分复杂、抑制物多的问题。此外,考虑到部分生物基咪唑化合物为大宗化学品,市场需求量大但附加值低,因此开发有效的辅因子再生技术,实现辅因子在氧化态和还原态中间高效转换,是控制ADH催化系统综合成本、提升经济性的关键^[12]。目前,辅因子再生系统的主要研究方向有:化学法再生、酶法再生、光电化学再生等(表2)^[8-12, 17]。

表2 不同类型辅因子再生系统优缺点对比^[8-12, 17]

Table 2 Advantages and disadvantages of different cofactor regeneration systems^[8-12, 17]

再生方法	优点	缺点
化学法再生	反应速率快 成本低	反应体系中成分复杂分离困难 反应条件苛刻 环境不友好 易导致酶活性降低
酶法再生	反应条件温和 反应选择性强	成本高 酶易失活系统稳定性差 酶难回收 体系成分复杂分离困难
光/电再生	反应体系成分简单 反应条件温和和环保	反应速率慢 反应体系小 技术成熟度低

2.1 化学催化辅因子再生

化学法辅因子再生过程需要构建特定的基于化学催化剂的氧化还原反应。在此过程中,化学催化剂能够将质子或电子从底物中的氧化还原剂转移至辅因子,进而传递给ADH,推动氧化还原主反应进行。常用的化学催化剂为无机盐。例如,Na₂S₂O₄和NaBH₄常被用于还原型辅因子再生^[12]。化学法辅因子再生的主要问题包括:无机盐的引入易造成酶活性抑制;无机盐难以从反应液中分离,无法循环利用、成本较高;含无机盐废水易造成污染且难处置等。为实现绿色辅因子再生,近年来研究热点是开发和应用过渡金属配合物作为驱动辅因子再生的化学催化剂。例如,Canivet等^[42]设计了由Ru、Rh、Ir等稀有金属合成的水溶性1,10-菲罗啉配合物 $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{M}(\text{N}\text{N})\text{Cl}]^+$ [M为Ru、Rh、Ir;(NN)分别为1,10-菲罗啉、5-硝基-1,10-菲罗啉与5-氨基-1,10-菲罗啉],该配合物能够与ADH酶促反应结合并精确还原酮为光

学活性醇。在这一反应体系中, $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{M}(\text{N}\text{N})\text{Cl}]^+$ 分离为水溶性氯化物参与NAD⁺加氢。该类金属有机催化剂的优势在于:高底物选择性、高区域选择性以及与酶促反应的高适配性^[17]。然而,该类催化剂存在很大的局限性,导致无法广泛应用。例如,金属有机催化剂的活性中心多为贵金属,导致此类催化剂价格较高;催化剂易与主酶的氨基酸残基配位,造成酶的活性降低;催化剂的合成需要大量原料,造成环境污染^[43]。

2.2 酶驱动辅因子再生

酶法过程通常利用酶促反应实现辅因子再生,其优势在于高转化率和选择性,且辅因子再生过程与主酶的催化过程的兼容性较高^[18, 44]。酶驱动辅因子再生过程分为底物偶联法和酶偶联法等两种类型。底物偶联过程需要反应的酶具有底物氧化还原和辅因子再生的双功能性^[18, 45];而基于ADH的酶偶联催化过程需要多种酶的参与。在酶偶联法过程中,两种或多种酶以结合或游离的形式在同一催化体系中,对辅因子的催化方向相反^[5, 46-49]。通过引入NAD(P)H氧化酶、漆酶等,可实现ADH催化系统中氧化型辅因子再生^[50-53]。例如,辅因子氧化酶(NOX)可直接将ADH催化系统中的NAD(P)H重新氧化为NAD(P)⁺,同时将分子氧还原为过氧化氢或水。该反应产生的过氧化氢可参与ADH酶促反应^[54-62]。

除添加氧化还原酶外,也有报道采用血红蛋白(hemoglobin, Hb)、肌红蛋白(myoglobin, Mb)等蛋白质实现辅因子再生^[63-64]。例如, Jia等^[64]以过氧化氢为氧化剂,在Hb的催化下30 min内将NAD(P)H氧化为NAD(P)⁺,进而促进马肝醇脱氢酶(horse hepatic alcohol dehydrogenase, HLADH)氧化HMF产2,5-咪唑二羧酸(2,5-furandicarboxylic acid, FDCA)。之后,将HLADH置于马心脏野生型肌红蛋白(myoglobin, Mb)莨菪亭(scopoletin)溶剂系统中,糠醇(furfuryl alcohol, FOL)氧化合成2-糠酸(2-furoic acid, FCA)的产率达到了93%,且辅因子TTN值达到190。同时,该团队在反应中使用廉价人造辅因子

BNAH, 在没有BNAH的情况下, 没有发现氧化产物, 证实氧化产物BNA⁺具有可替代NAD⁺的活性^[63]。

2.3 光/电驱动辅因子再生

相比于化学、酶驱动辅因子再生过程, 光/电驱动辅因子再生的研究尚处于理论研究和应用基

础研究阶段。光驱动辅因子再生的过程类似于自然界中的光合作用^[65-67], 现有的研究多集中在光驱动还原型辅因子的再生方面, 而面向氧化型辅因子再生的报道相对较少^[68]。如图2所示, 光驱动酶催化系统一般由氧化还原剂、光催化剂、电子介体、辅因子、主酶等元件构成^[67]。在还原型辅因子再生过程中, 光照激发光敏材料价带产生电

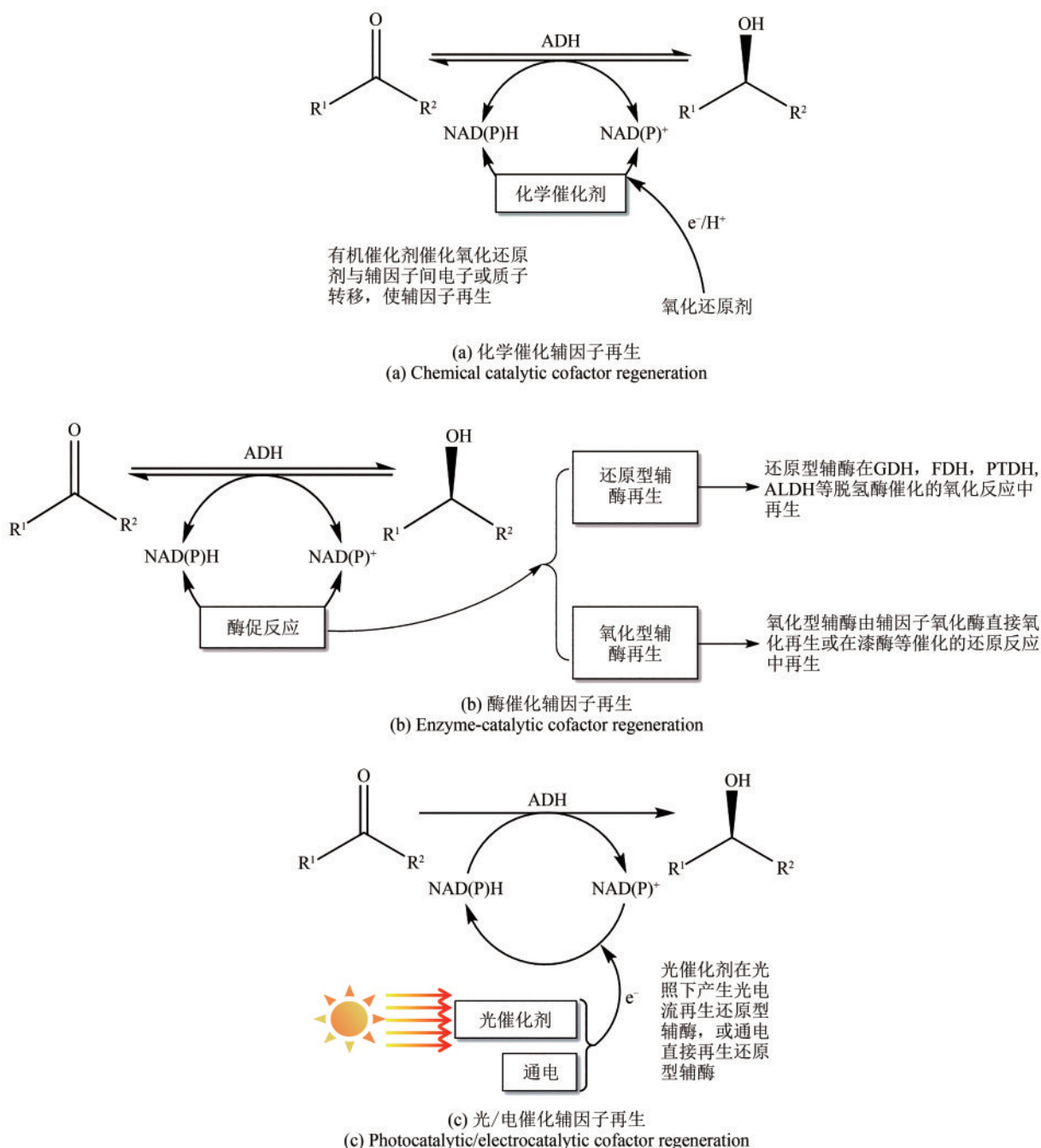


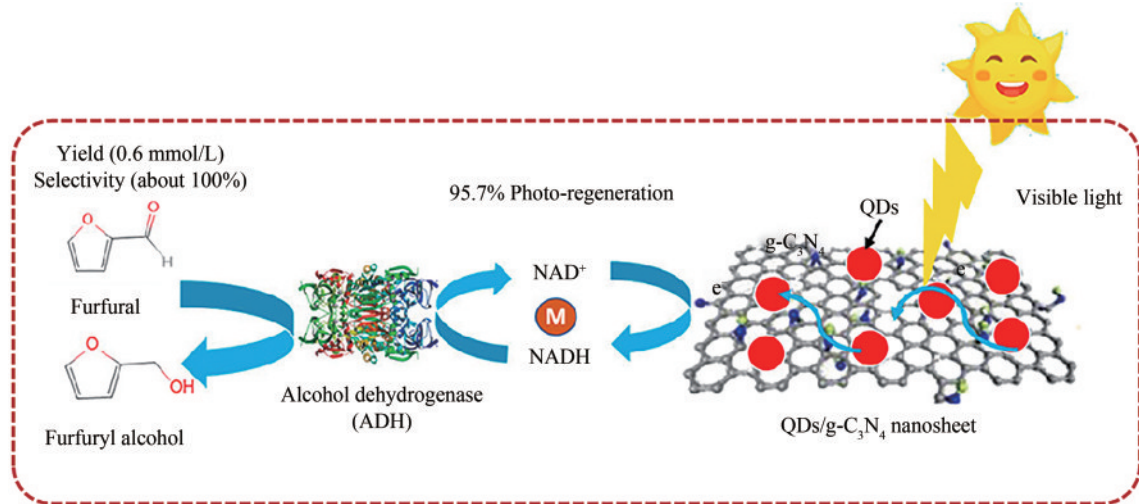
图2 不同类型辅因子再生系统原理

Fig. 2 Schematic diagram of cofactor regeneration systems

子并跃迁到导带上，形成电子空穴并被电子供体猝灭。在此过程中，产生的光生电子传递给氧化态辅因子或电子介体获得还原型辅因子^[69]。

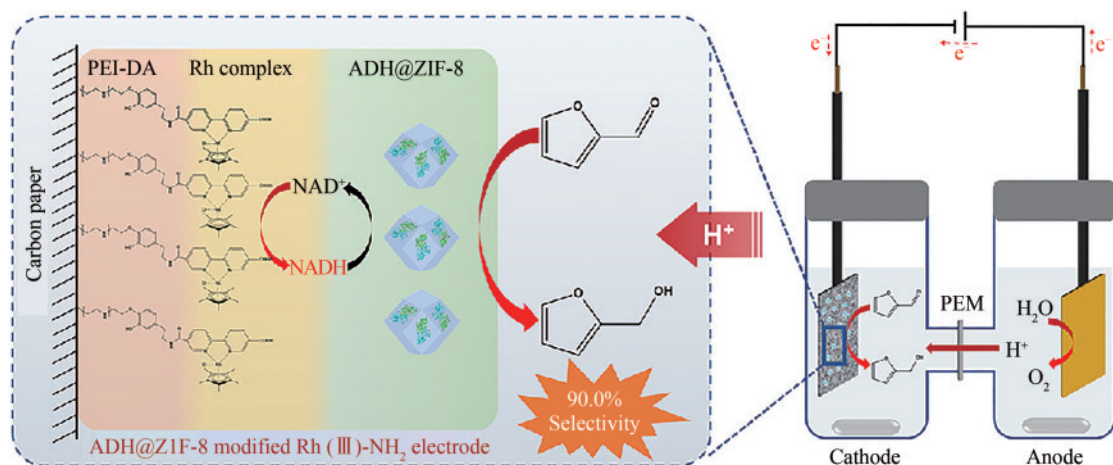
根据反应动力学分析结果，提升光敏材料的光生电子激发和转移效率是实现高效光驱动辅因子再生的关键^[70]。目前该方向的研究热点之一是开发除单纯半导体材料、石墨烯基材料、金属纳米颗粒等光催化剂之外的高性能光催化剂^[71]。例如 Yu 等^[72]使用羧基修饰 C₃N₄后将 CdSe/ZnS 纳米颗粒均匀滴加在表面，获得能够高效催化辅因子还原且具有良好稳定性的光催化剂，用于辅助

ADH 高效选择性催化 FAL 生成 FOL [图 3(a)]。Zhao 等^[73]将含有电子介体 [M] 和辅因子 NAD⁺ 的聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 附着在 ZnIn₂S₄ 表面，获得 Z 型光催化剂。亦有报道采用低成本有机染料，如卟啉衍生物、曙红等作为光敏剂用于强化辅因子再生^[74-75]。此外，一些 MOF、COF、HOF 等骨架材料在光驱动辅因子再生方向展示出了一定潜力^[76-77]。另一研究热点是通过分子元件的整合和固定，缩短各元件的空间距离，以避免游离系统中光生电子随机转移或逆向传递导致的能量损失及分子元件稳定性差、回收难等问题^[78-79]。



(a) ADH-C₃N₄ 耦合系统光催化 FAL 选择性还原^[73]

(a) Photocatalytic selective reduction of FAL by ADH-C₃N₄ coupled system^[73]



(b) ADH@ZIF-8 修饰的 Rh(III)-NH₂ 复合电极催化 FAL 还原^[93]

(b) FAL reduction catalyzed by Rh(III)-NH₂ composite electrode with embellished ADH@ZIF-8^[93]

图 3 几种基于光/电驱动辅因子再生的 ADH 催化生物基呋喃化合物系统

Fig. 3 Several systems of bio-based furan compounds catalyzed by ADH enzymes based on photo/electricity-driven cofactor regeneration

光驱动辅因子再生技术与化学和酶法技术相比,不需要额外引入酶活底物,减少了产物分离负担^[80-81]。但该类方法尚需要克服光敏剂和电子介体成本高,分子元件整合系统电子传递和传质阻力大,光照产生的强氧化剂和自由基对酶活性的不利影响等局限^[82-83]。

如图2所示,电驱动辅因子再生的原理类似于光驱动过程,不同之处在于电驱动系统由电极产生的电力提供氧化还原当量^[84]。该类过程可大体分为直接再生、间接再生、间接酶偶联等三种类型^[85]。例如,在还原性辅因子的直接再生过程中,第一步阴极电子提供给电极表面的氧化型 NAD(P)^+ 并形成 NAD(P)^+ 自由基,在第二步中,自由基被还原并质子化后得到 NAD(P)H ^[86]。然而在直接再生过程中,第一步反应产生的自由基可以聚合为二聚体副产物,导致辅因子循环系统的稳定性较差^[87]。相比之下,间接再生过程通过引入电子介体在电极和辅因子之间穿梭,可以在一个动力学步骤中完成两个电子或一个氢离子的转移,在一定程度上解决辅因子直接再生的第二个动力学过程选择性低、反应缓慢等问题^[88]。Zhan等^[89]利用 $[\text{M}]\{\text{M为}[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{III})\text{(bpy)}\text{Cl}],\text{Cp}^*\text{为五甲基环戊二烯基,bpy为}2,2'\text{-联吡啶-}5,5'\text{-二羧酸}\}$ 极大地提升了电酶系统中电子的传递和辅因子再生效率。不同于基于酶法的间接酶偶联需要在系统内引入第二个氧化还原酶形成双酶系统的辅因子再生过程,在电化学辅助系统中,间接酶偶联过程仅涉及电极电子的转移,而不需要在系统内引入氧化还原共底物^[84, 90]。因此从分离难易角度考虑,电驱动间接酶偶联辅因子再生相较于酶驱动辅因子再生过程更具优势^[12, 91-92]。

与光驱动辅因子再生过程类似,如何实现电子在电驱动辅因子再生系统中的有效传递是提升电-酶耦合过程的关键。鉴于此,Zhan等^[89, 93]开发了一种电-ADH催化FAL高选择性生成FOL系统,利用由外固定化酶层和 $[\text{M}]$ 夹层组成的有序复合生物电极促进了ADH催化过程,并获得优良的系统稳定性和重复利用性[图3(b)]。此外,也有部分研究在光酶耦合基础上引入电驱动过程促进光生电子的传递。该类过程不但能够有效提升系统的电子传输效率,同时实现了光生电子和电

子转移过程的解耦,为光酶耦合机理挖掘提供必要依据^[65, 94]。

3 基于ADH的生物基呋喃衍生物催化升级

农业废弃物等低值木质纤维素资源储量巨大,是重要的绿色生物制造原料。木质纤维素中的纤维素、半纤维素等组分占比较高,主要为葡萄糖、木糖等单体通过糖苷键连接形成的聚合物^[95]。这些糖基聚合物在酸的催化作用下经水解、异构化、脱水等反应,可制备FAL、HMF等富含甲酰基、伯羟基等活性基团的生物基呋喃化合物^[96]。该类化合物经氧化还原、加氢、氨化等反应,可进一步转化为高附加值精细化学品、替代燃料、可再生材料前体等^[97]。例如,HMF是美国能源部(DOE)生物基化学品的“Top 10+4”名单之一^[98-99],相比于FAL、FOL等只含一个活性基团的呋喃化合物,HMF可以通过氧化、还原、氨化等合成许多高附加值产品如2,5-二甲酰基呋喃(furan-2,5-dicarbaldehyde, DFF)、5-羟甲基-2-呋喃羧酸(5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid, HMFA)、FCA、5-甲酰基-2-呋喃羧酸(5-formylfuran-2-carboxylic acid, FFCA)和FDCA等多种化合物。

ADH普遍存在于各类生物体内,催化机制明晰,定向方法成熟。在已有文献中已证实ADH可用于生物基呋喃化合物的氧化还原过程,并具备较高的催化效率^[13]。如图4所示,基于ADH的生物基呋喃催化研究主要面向HMF、FAL等分子的伯羟基和/或甲酰基活化展开,并可与其他酶促、化学反应的级联制备多种衍生物^[100-101]。该领域的主要研究进展汇总于表3。大体上,根据反应类型可将相关的研究进一步细分为基于ADH的单酶催化、多酶耦合/级联、全细胞催化等类型。

3.1 单酶催化

基于ADH的单酶催化系统构建的研究相对广泛。考虑到ADH为辅因子依赖型酶且辅因子成本高等问题,该类研究多集中于开发高效辅因子再生系

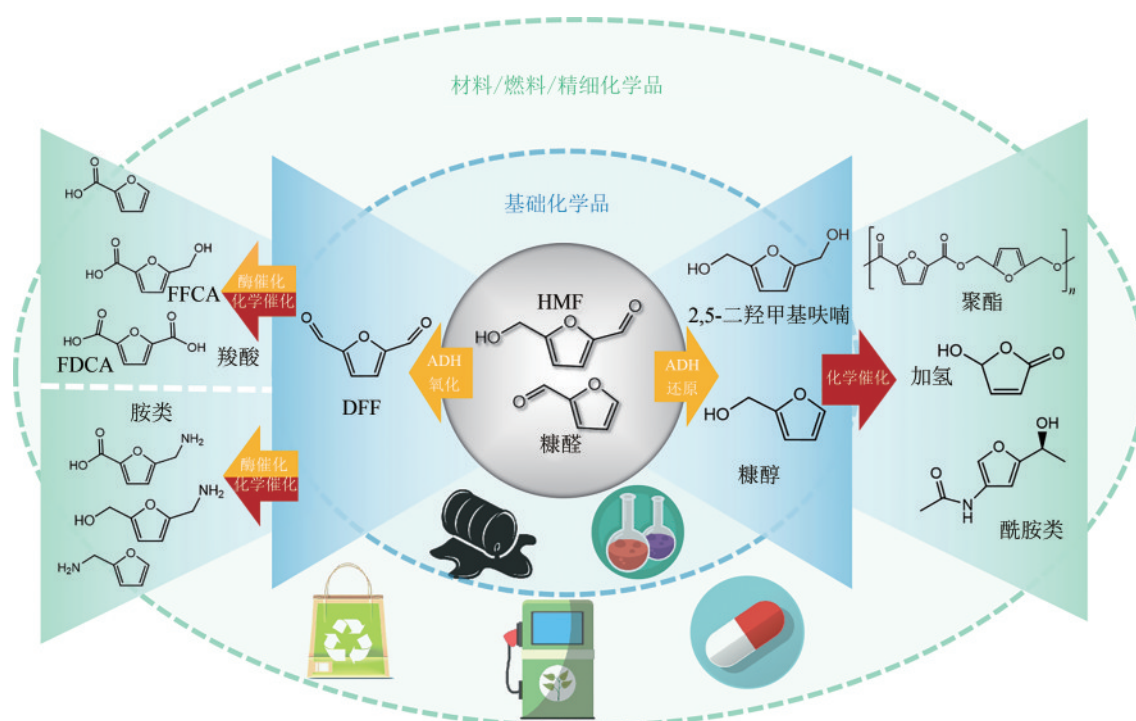


图4 生物基呋喃及衍生物合成路线

Fig. 4 Synthetic route of biobased furan and its derivatives

统和寻找底物高选择性酶，以实现低成本高效率生物基呋喃催化转化。例如，有报道采用来自牛晶状体、大肠杆菌和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的 NADH 依赖性 ADH——BovADH、EcADH 和 PpADH 在 NADH 氧化酶 (NOX) 的辅因子中可氧化 HMF 和 FAL 为羧酸，转化率达 99%^[102]。而针对 HMF 的氧化过程，Jia 等^[108] 发现 HLADH 可实现高效甲酰基的氧化，催化 HMF 氧化生成 HMFCFA 并达到了 85%~97% 的产率。除前一节中已详述的辅因子再生系统与 ADH 催化生物基呋喃化合物氧化还原的研究案例外，一些研究通过引入人造辅因子，实现 ADH 催化过程中低成本辅因子再生。例如，Jia 等^[63-64] 使用了更为廉价人造辅因子 BNAH，并证实氧化产物 BNA⁺ 可替代原反应过程的 NAD⁺。

3.2 多酶级联催化

与单酶系统相比，多酶级联过程能够将 ADH 与其他氧化还原酶、转氨酶、脂肪酶等下游酶促反应过程结合 (如图 5)，进一步将 ADH 催化产物作为中间体进行进一步生物催化增值^[109-110]。例

如，Sattler 等^[103] 构建了 ADH、转氨酶和丙氨酸脱氢酶“一锅法”催化系统，由 ADH 消耗 NAD⁺ 氧化生成醛和 NADH。随后， ω -转氨酶以 L-丙氨酸作为胺供体使醛基氨化，L-丙氨酸脱氢酶 (L-alanine dehydrogenase, AlaDH) 消耗 NH₃ 使 NADH 和 L-丙氨酸再生。AlaDH 对 NADH 与丙酮酸同时进行再生，使辅因子和胺供体能够及时发挥作用。而 Velasco-Lozano 等^[104] 对酶进行固定化处理，将 ADH、 ω -转氨酶和氧化酶共固定在多孔载体上，这种催化剂可分别从醇和二醇合成胺和氨基醇，同时将氧化还原辅因子和胺供体回收系统整合到氨基醇生物合成中，显著提高了辅因子回收效率和产物收率。再如，Wu 等^[33] 使用含有 GDH 和对 HMF 高耐受性高催化活性 ADH (*EcYjgB*) 的重组菌株实现了 HMF 还原产 BHMf，之后级联来自 *Mycobacterium smegmatis* 的酰基转移酶 (acyltransferase, AcTs) 的催化过程将 BHMf 催化为双酯。

通过多酶级联的“一锅法”转化过程可显著简化目标产品的生产过程，但不同酶催化系统的匹配性、催化效率差异等问题在设计相关系统时需要重点关注。例如，Jia 等^[105] 提出了由半乳糖氧化酶 (galactose oxidase, GOase) 和 ADH 组成

表3 基于ADH的生物基呋喃化合物酶催化研究进展

Table 3 Summary of catalytic reactions of bio-based furan derivatives

类型	酶/菌种名称	底物	产物	特点	参考文献
单酶催化	HLADH	FAL	FOL	使用肌红蛋白作为催化剂使辅因子再生 证明人造辅因子BNAH可用于替代呋喃合成过程中的NAD(P)H等 48 h FOL产率高达93%	[63]
	HLADH	FAL	FCA	使用血红蛋白作为催化剂使辅因子再生 48 h FAL转化率100%, FCA产率达到98%	[64]
		HMF	HMFCFA	使用血红蛋白作为催化剂使辅因子再生 60 h HMF转化率100%, HMFCFA产率81%	
		FFCA	FDCA	使用血红蛋白作为催化剂使辅因子再生 108 h FFCA转化率79%, FDCA产率54%	
	ADH	FAL	FOL	使用血红蛋白作为催化剂使辅因子再生 60 h DFF转化率100%, FDCA产率96%	[65] [93]
				通过构筑Rh电子介体-固定化ADH复合电极, 电化学方式辅助辅因子再生 FAL还原为FOL的选择性达96.4%, 产率90.0%	
	ADH	FAL	FOL	使用附着有CdSe/ZnS纳米颗粒的C ₃ N ₄ 作为光催化剂驱动辅因子再生 达到近100%的FAL转化率, 产物FOL浓度为0.6 mmol/L	[73]
	BovADH	FAL	FCA	对羰基氧化成羧基有高反应活性	[102]
		HMF	HMFCFA	FAL、HMF转化率达99% 在pH8.5情况下活性温度在40 °C以上	
	EcADH	FAL	FCA	对羰基氧化成羧基有高反应活性	[102]
HMF		HMFCFA	FAL、HMF转化率达99% 在pH8.5情况下活性温度在40 °C以上		
PpADH	FAL	FCA	在pH8.5下活性温度在40 °C以上	[102]	
	HMF	HMFCFA	对羰基氧化成羧基有高反应活性, FAL、HMF转化率达99%		
多酶级联催化	GDH + ADH + AcTs	HMF	BHMF	设计了一种共表达GDH与EcYjgB的大肠杆菌重组菌株, 实现了HMF的还原与辅因子的再生, BHMF产率高达15 g/(L·h), HMF收率大于99% 使用AcTs催化BHMF酯化反应, HMF生产BHMF双酯总产率达到88%	[33]
	AlaDH + ADH + ω-TA	BHMF	呋喃氨基醇	可通过控制级联中助溶剂的种类和比例控制氨基醇和二胺的选择性 辅因子与氨供体在级联体系中可循环使用 在10% DME, 20 °C下BHMF的转化率和二胺的产率均达到了99%	[103]
	ADH + L-AlaDH + ω-TA	HMF	呋喃二甲胺	设计了一种用于固定化酶的多孔载体, 使固定化酶活性下降不超过10%, ADH回收利用率达84% HMF转化率达80%	[104]
	GOase + ADH	HMF	FDCA	通过控制不同的底物浓度、反应时间、CaCO ₃ 的添加量、两种酶的浓度和比例, 实现FDCA、FFCA可控合成 10 mmol/L HMF, 1.6 μmol/L GOase与36 μmol/L HLADH反应60h时的HMF转化率达到99%, FDCA产率95%	[105]
HMF		FFCA	通过控制不同的底物浓度、反应时间、CaCO ₃ 的添加量、两种酶的浓度和比例, 实现FDCA、FFCA可控合成 100 mmol/L HMF, 3.2 μmol/L GOase与66 μmol/L SADH反应48h时的HMF转化率达到99%, FFCA产率97%		
全细胞催化	<i>Comamonas testosteroni</i> SC1588	HMF	HMFCFA	对HMF耐受性好, 低浓度FOL可提高菌体活性, 组氨酸可进一步提高菌体耐受性并控制pH HMF转化率达100%, 且对HMFCFA的选择性为87%~88%	[33]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NL22	FAL	FOL	对FAL耐受性好, 在100 mmol/L FAL中仍保持高催化活性 8 h FAL转化率达到98%, 还原为FOL选择性高达87.9%	[106]
	<i>Escherichia coli</i> TS	FAL	FA	优化含HLADH的 <i>Escherichia coli</i> TS菌体催化活性 72 h将25 mmol/L FAL完全转化为FA	[107]

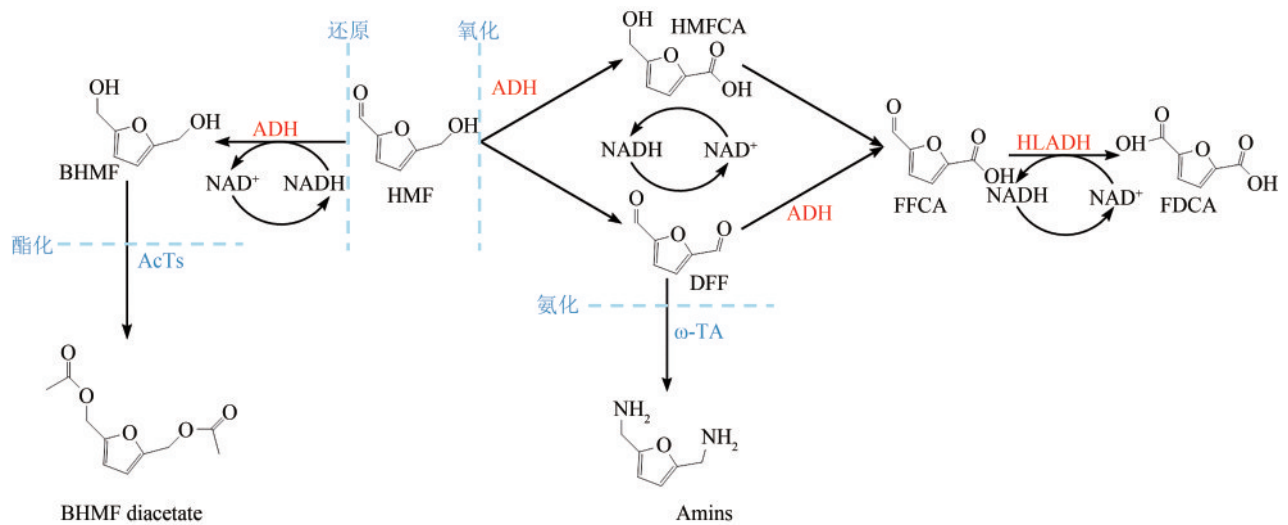


图5 基于ADH的多酶级联催化HMF高值化路线

Fig. 5 Primary strategies of ADH based multi-enzyme cascade reactions for HMF

的新型双酶系统，用于HMF的级联氧化。反应过程中，GOase催化氧化的同时消耗氧分子生成 H_2O_2 ，而ADH所消耗的辅因子可以通过 H_2O_2 进行再生。通过控制不同的底物浓度、反应时间、 $CaCO_3$ 的添加量、两种酶的浓度和比例，可实现FFCA和FDCA的可控合成。需要指出的是，由于“一锅化”反应体系一般副产物多，相较于单酶催化系统，多酶催化系统在后续的分离纯化步骤存在一定困难，需要引起足够重视。

3.3 全细胞催化

作为生物催化剂，酶需要经分离纯化等复杂工艺过程后才可以进行催化应用，而使用全细胞进行催化则大大简化了催化剂的制备程序，成本更低。此外，在全细胞催化过程中，细胞自身可提供氧化所需的辅因子NAD(P)H，简化了辅因子再生系统，从而避免了外源辅因子的添加和损耗^[97, 111-112]。

目前，基于ADH的全细胞催化转化生物基呋喃化合物的研究重点为：如何实现全细胞催化剂对上游催化毒性副产物的耐受性，以实现更高浓度下生物基呋喃化合物的催化转化^[102, 113-115]。为了降低呋喃衍生物毒性对全细胞催化造成的影响，一些研究试图通过筛选、改造等方式以获得对呋喃衍生物具有高抗性的菌株。例如，Yan等^[115]从四种野生菌中筛选出了*Saccharomyces cerevisiae*

NL22耐受性菌株并应用于FAL选择性还原产生FOL，该菌株在30℃下8h对62mmol/L的FAL的转化率达到98%，选择性87.9%。Peng等^[107]设计表达了HLADH的*Escherichia coli* TS工程菌。该菌株在100mmol/L以上浓度FAL发生抑制，远高于其他菌种，且能够将浓度为6.5g/L的FAL以98%的转化率氧化为7.5g/L的FA。再如，Wu等^[33]构建了一种能够高效催化HMF还原与辅因子再生的重组菌株。该菌株将HMF高耐受性(1mol/L)与高催化效率(1300s·L/mmol)的ADH(*EcYjgB*)与GDH在*Escherichia coli* BL21(ED3)中共表达，能够完成BHMF的生成和辅因子的循环，BHMF产率接近100%。

4 总结与展望

酶催化反应的优点如反应条件温和、选择性高等决定了酶促反应的优越性，但酶促反应也同样存在着易失活、底物浓度低、成本高等技术难点有待突破。基于酶法催化路线需要从催化剂开发、反应路径、制备系统等多个层面与化学催化过程进行对比和竞争，因此进一步降低生物催化过程的成本，突出生物催化过程的优势，是未来面向技术发展与实际应用的主要方向。

作为广泛存在于生物体内的酶，对ADH作用机制的研究相比于其他酶更加透彻^[116]，制备成本

相对低廉。尽管绝大部分 ADH 可较高效地实现催化醇羟基与其对应醛或酮之间的相互转化, 但不同来源的 ADH 酶对生物基呋喃化合物的催化活性存在差异。随着酶的分子设计和定向改造技术的日趋成熟, ADH 经过改造后可扩大底物适用范围、提升反应活性。

ADH 酶促反应需要辅因子 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 的参与。相比其他辅因子再生技术, 光电驱动辅因子再生可简化反应底物, 具有较大潜力, 但尚需在高性能光/电催化剂、有机-无机界面电子/质子传递、分子元件的固定和回收、高效反应器开发等方面的技术革新方能应用于实际过程。相比之下, 传统的化学、酶驱动辅因子再生过程更加成熟。此外, 微生物体内存在完整的辅因子再生系统。相较于体外的 ADH 酶催化系统, 全细胞催化过程的成本更加低廉, 有一定的工业化应用潜力。考虑到生物基呋喃衍生物的底物系统抑制物多、毒性大, 开发高耐受性的高 ADH 活性菌株是解决全细胞催化低底物浓度、低转化效率问题的关键。

目前已报道的 ADH 催化生物基呋喃衍生物的研究多集中在基础化合物 HMF 和糠醛的选择性氧化还原上, 其催化产物附加值相对较低, 因此还难以与化学路线竞争。然而, ADH 一般在还原羰基为羟基时有一定的对映体选择性, 这一特性有望在呋喃衍生的旋光性精细生物基化学品制备过程中发挥独特作用。此外, 从现有报道来看, 已有研究通过基于 ADH 的多酶系统构建制备附加值较高的生物基手性胺等分子。相信随着相关技术的迭代进步和改进, ADH 在生物基呋喃化合物的制备过程中会扮演更重要的角色, 助力相关传统化工过程的绿色转型。

参 考 文 献

- [1] DONG J J, FERNÁNDEZ-FUEYO E, HOLLMANN F, et al. Biocatalytic oxidation reactions: a chemist's perspective[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(30): 9238-9261.
- [2] MAGOMEDOVA Z, GRECU A, SENSEN C W, et al. Characterization of two novel alcohol short-chain dehydrogenases/reductases from *Ralstonia eutropha* H16 capable of stereoselective conversion of bulky substrates[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 221: 78-90.
- [3] SHANMUGANATHAN S, NATALIA D, GREINER L, et al. Oxidation-hydroxymethylation-reduction: a one-pot three-step biocatalytic synthesis of optically active α -aryl vicinal diols[J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(1): 94-97.
- [4] STAMPFER W, KOSJEK B, MOITZI C, et al. Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(6): 1014-1017.
- [5] VELASCO-LOZANO S, ROCHA-MARTIN J, FAVELATORRES E, et al. Hydrolysis and oxidation of racemic esters into prochiral ketones catalyzed by a consortium of immobilized enzymes[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 112: 136-142.
- [6] VOSS C V, GRUBER C C, FABER K, et al. Orchestration of concurrent oxidation and reduction cycles for stereoinversion and deracemisation of sec-alcohols[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(42): 13969-13972.
- [7] VOSS C V, GRUBER C C, KROUTIL W. Deracemization of secondary alcohols through a concurrent tandem biocatalytic oxidation and reduction[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(4): 741-745.
- [8] KOCHIUS S, MAGNUSSON A O, HOLLMANN F, et al. Immobilized redox mediators for electrochemical NAD(P)^+ regeneration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 2251-2264.
- [9] BURNETT J W H, CHEN H, LI J W, et al. Supported Pt enabled proton-driven NAD(P)^+ regeneration for biocatalytic oxidation[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(18): 20943-20952.
- [10] LIU W F, WANG P. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(4): 369-384.
- [11] NISHIGAKI J I, ISHIDA T, HONMA T, et al. Oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by Au cluster and nanoparticle catalysts aiming for coenzyme regeneration in enzymatic glucose oxidation[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(28): 10413-10422.
- [12] WU H, TIAN C Y, SONG X K, et al. Methods for the regeneration of nicotinamidecoenzymes[J]. *Green Chemistry*, 2013, 15(7): 1773-1789.
- [13] 许松伟, 姜忠义, 吴洪. 醇脱氢酶结构和作用机理研究进展[J]. *有机化学*, 2005, 25(6): 629-633.
XU S W, JIANG Z Y, WU H. Progress in structure and kinetic mechanism of alcohol dehydrogenase[J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2005, 25(6): 629-633.
- [14] RADIANGTYAS H, WRIGHT P C. Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria

- [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(5): 593-616.
- [15] FABER K. *Biotransformations in Organic Chemistry*[M/OL]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004 [2023-07-01]. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-18537-3>.
- [16] ZHANG Z B, MUSCHIOL J, HUANG Y H, et al. Efficient ionic liquid-based platform for multi-enzymatic conversion of carbon dioxide to methanol[J]. *Green Chemistry*, 2018, 20(18): 4339-4348.
- [17] 李慧敏, 李宁宁, 翁建清, 等. 酶促还原过程中辅因子的再生研究[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 18(6): 605-609, 668.
LI H M, LI N N, WENG J Q, et al. Regeneration of cofactors in enzymatic reduction[J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 18(6): 605-609, 668.
- [18] VAN DER DONK W A, ZHAO H M. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(4): 421-426.
- [19] 吉爱国, 高培基. 烟酰胺类辅因子的保留和再生研究进展[J]. *药物生物技术*, 1997, 4(2): 122-128.
JI A G, GAO P J. Advances in retention and regeneration of nicotinamide cofactors[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 1997, 4(2): 122-128.
- [20] YEH A H W, NORN C, KIPNIS Y, et al. *De novo* design of luciferases using deep learning[J]. *Nature*, 2023, 614(7949): 774-780.
- [21] 周柱, 查凡, 张琴, 等. *Klebsiella* sp.WL1316 乙醇脱氢酶基因过表达提高乙醇生产效率[J]. *化学工程*, 2022, 50(10): 1-7.
ZHOU Z, ZHA F, ZHANG Q, et al. Overexpression of alcohol dehydrogenase in *Klebsiella* sp. WL1316 to improve hydrogen production efficiency[J]. *Chemical Engineering (China)*, 2022, 50(10): 1-7.
- [22] HOLLMANN F, ARENDS I W C E, BUEHLER K. Biocatalytic redox reactions for organic synthesis: nonconventional regeneration methods[J]. *ChemCatChem*, 2010, 2(7): 762-782.
- [23] BORNSCHEUER U T, HUISMAN G W, KAZLAUSKAS R J, et al. Engineering the third wave of biocatalysis[J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 185-194.
- [24] BÖTTCHER D, BORNSCHEUER U T. Protein engineering of microbial enzymes[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(3): 274-282.
- [25] 李寅. 合成生物制造 2022[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(3): 807-841.
LI Y. Biomanufacturing driven by engineered organisms (2022) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(3): 807-841.
- [26] 曲戈, 袁波, 孙周通. 工业蛋白质理性设计与应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4068-4080.
QU G, YUAN B, SUN Z T. Rational design and applications of industrial proteins[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4068-4080.
- [27] 韩旭, 李倩, 韦泓丽, 等. 工业应用导向的蛋白质结构与功能研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4050-4067.
HAN X, LI Q, WEI H L, et al. Application-oriented structure and function study of proteins: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4050-4067.
- [28] XU J L, ZHOU H S, YU H R, et al. Computational design of highly stable and soluble alcohol dehydrogenase for NADPH regeneration[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8: 12.
- [29] MUSA M M, LOTT N, LAIVENIEKS M, et al. A single point mutation reverses the enantioselectivity of *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase[J]. *ChemCatChem*, 2009, 1(1): 89-93.
- [30] ZIEGELMANN-FJELD K I, MUSA M M, PHILLIPS R S, et al. A *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase mutant derivative highly active and stereoselective on phenylacetone and benzylacetone[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2007, 20(2): 47-55.
- [31] FIORENTINO G, CANNIO R, ROSSI M, et al. Decreasing the stability and changing the substrate specificity of the *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase by single amino acid replacements[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1998, 11(10): 925-930.
- [32] GOIHERBERG E, DYM O, TEL-OR S, et al. Thermal stabilization of the protozoan *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase by a single proline substitution[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2008, 72(2): 711-719.
- [33] WU Q A, ZONG M H, LI N. One-pot chemobiocatalytic production of 2,5-bis(hydroxymethyl)furan and its diester from biomass in aqueous media[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(14): 9404-9414.
- [34] PHILLIPS R S. Tailoring the substrate specificity of secondary alcohol dehydrogenase[J]. *Canadian Journal of Chemistry*, 2002, 80(6): 680-685.
- [35] CAMPBELL E, WHEELDON I R, BANTA S. Broadening the cofactor specificity of a thermostable alcohol dehydrogenase using rational protein design introduces novel kinetic transient behavior[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(5): 763-774.
- [36] WULF H, MALLIN H, BORNSCHEUER U T. Protein engineering of a thermostable polyol dehydrogenase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(4): 217-224.
- [37] ROSELL A, VALENCIA E, OCHOA W F, et al. Complete

- reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(42): 40573-40580.
- [38] GOIHERG E, PERETZ M, TEL-OR S, et al. Biochemical and structural properties of chimeras constructed by exchange of cofactor-binding domains in alcohol dehydrogenases from thermophilic and mesophilic microorganisms[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(9): 1943-1953.
- [39] PIETRICOLA G, CHAMORRO L, CASTELLINO M, et al. Covalent immobilization of dehydrogenases on carbon felt for reusable anodes with effective electrochemical cofactor regeneration[J]. *ChemistryOpen*, 2022, 11(11): e202200102.
- [40] THOMPSON M P, TURNER N J. Two-enzyme hydrogen-borrowing amination of alcohols enabled by a cofactor-switched alcohol dehydrogenase[J]. *ChemCatChem*, 2017, 9(20): 3833-3836.
- [41] POIZAT M, ARENDS I W C E, HOLLMANN F. On the nature of mutual inactivation between[Cp*Rh(bpy) (H₂O)]²⁺ and enzymes-analysis and potential remedies[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 63(3/4): 149-156.
- [42] CANIVET J, SÜSS-FINK G, ŠTĚPNIČKA P. Water-soluble phenanthroline complexes of rhodium, iridium and ruthenium for the regeneration of NADH in the enzymatic reduction of ketones[J]. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2007, 2007(30): 4736-4742.
- [43] 曹礼梅, 邱兆富, 张巍, 等. 化工废催化剂污染特征及资源化途径[J]. *化工进展*, 2021, 40(10): 5293-5301.
- CAO L M, QIU Z F, ZHANG W, et al. Pollution and utilization of chemical industry spent catalysts[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2021, 40(10): 5293-5301.
- [44] CHENAULT H K, WHITESIDES G M. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1987, 14(2): 147-197.
- [45] KOSJEK B, STAMPFER W, POGOREVC M, et al. Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 86(1): 55-62.
- [46] CAZELLES R, DRONE J, FAJULA F, et al. Reduction of CO₂ to methanol by a polyenzymatic system encapsulated in phospholipids-silica nanocapsules[J]. *New Journal of Chemistry*, 2013, 37(11): 3721-3730.
- [47] AKSU S, ARENDS I W C E, HOLLMANN F. A new regeneration system for oxidized nicotinamide cofactors[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2009, 351(9): 1211-1216.
- [48] SINGH R K, SINGH R, SIVAKUMAR D, et al. Insights into cell-free conversion of CO₂ to chemicals by a multienzyme cascade reaction[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(12): 11085-11093.
- [49] WANG Z J, CLARY K N, BERGMAN R G, et al. A supramolecular approach to combining enzymatic and transition metal catalysis[J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(2): 100-103.
- [50] TISHKOV V I, POPOV V O. Protein engineering of formate dehydrogenase[J]. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23(2/3): 89-110.
- [51] JOHANNES T W, WOODYER R D, ZHAO H M. Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(1): 18-26.
- [52] LOPEZ DE FELIPE F, KLEEREBEZEM M, DE VOS W M, et al. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(15): 3804-3808.
- [53] WECKBECKER A, HUMMEL W. Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH[M/OL]//BARREDO J L. *Microbial enzymes and biotransformations*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005: 225-238[2023-07-01]. <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-846-3:225>.
- [54] RIEBEL B, GIBBS P, WELLBORN W, et al. Cofactor regeneration of NAD⁺ from NADH: novel water-forming NADH oxidases[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2002, 344(10): 1156-1168.
- [55] RIEBEL B, GIBBS P, WELLBORN W, et al. Cofactor regeneration of both NAD⁺ from NADH and NADP⁺ from NADPH: NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2003, 345(6/7): 707-712.
- [56] HUMMEL W, RIEBEL B. Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(1): 51-54.
- [57] HUMMEL W, KUZU M, GEUEKE B. An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure-*tert*-leucine[J]. *Organic Letters*, 2003, 5(20): 3649-3650.
- [58] GEUEKE B, RIEBEL B, HUMMEL W. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(2): 205-211.
- [59] JIANG R R, BOMMARIUS A S. Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (nox-1) from *Lactococcus lactis*[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15(18): 2939-2944.
- [60] HIRANO J I, MIYAMOTO K, OHTA H. Purification and characterization of thermostable H₂O₂-forming NADH oxidase from 2-phenylethanol-assimilating *Brevibacterium* sp. KU1309 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(1): 71-78.

- [61] HUANG L, SAYOGA G V, HOLLMANN F, et al. Horse liver alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidative lactamization of amino alcohols[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(9): 8680-8684.
- [62] NOWAK C, BEER B, PICK A, et al. A water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus pentosus* suitable for the regeneration of synthetic biomimetic cofactors[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 957.
- [63] JIA H Y, ZONG M H, ZHENG G W, et al. Myoglobin-catalyzed efficient *in situ* regeneration of NAD(P)⁺ and their synthetic biomimetic for dehydrogenase-mediated oxidations [J]. ACS Catalysis, 2019, 9(3): 2196-2202.
- [64] JIA H Y, ZONG M H, YU H L, et al. Dehydrogenase-catalyzed oxidation of furanics: exploitation of hemoglobin catalytic promiscuity[J]. ChemSusChem, 2017, 10(18): 3524-3528.
- [65] LEE S H, CHOI D S, KUK S K, et al. Photobiocatalysis: activating redox enzymes by direct or indirect transfer of photoinduced electrons[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57(27): 7958-7985.
- [66] MACIÁ-AGULLÓ J A, CORMA A, GARCIA H. Photobiocatalysis: the power of combining photocatalysis and enzymes[J]. Chemistry-A European Journal, 2015, 21(31): 10940-10959.
- [67] YANG D, ZOU H J, WU Y Z, et al. Constructing quantum Dots@Flake graphitic carbon nitride isotype heterojunctions for enhanced visible-light-driven NADH regeneration and enzymatic hydrogenation[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017, 56(21): 6247-6255.
- [68] 吕陈秋, 姜忠义, 王姣. 烟酰型辅酶 NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 再生的研究进展[J]. 有机化学, 2004, 24(11): 1366-1379.
- LÜ C Q, JIANG Z Y, WANG J. Progress in regeneration of NAD(P)⁺ and NAD(P)H[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2004, 24(11): 1366-1379.
- [69] 周一诺, 杨楠, 田瑶, 等. 基于辅因子的光驱动酶催化复合体系[J]. 科学通报, 2020, 65(36): 4213-4222.
- ZHOU Y N, YANG N, TIAN Y, et al. Cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems[J]. Chinese Science Bulletin, 2020, 65(36): 4213-4222.
- [70] LI S H, SHI J F, LIU S S, et al. Molecule-electron-proton transfer in enzyme-photo-coupled catalytic system[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2023, 44: 96-110.
- [71] SÁNCHEZ-IGLESIAS A, CHUVILIN A, GRZELCZAK M. Plasmon-driven photoregeneration of cofactor molecules[J]. Chemical Communications, 2015, 51(25): 5330-5333.
- [72] YU S S, ZHANG S D, LI K N, et al. Furfuryl alcohol production with high selectivity by a novel visible-light driven biocatalysis process[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(42): 15980-15988.
- [73] ZHAO H Q, QI Y N, ZHAN P, et al. Artificial photoenzymatic reduction of carbon dioxide to methanol by using electron mediator and co-factor assembled ZnIn₂S₄ nanoflowers[J]. ChemSusChem, 2023, 16(12): e202300061.
- [74] JARVIS A G. Designer metalloenzymes for synthetic biology: enzyme hybrids for catalysis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2020, 58: 63-71.
- [75] WANG Y Z, SUN J, ZHANG H H, et al. Tetra (4-carboxyphenyl) porphyrin for efficient cofactor regeneration under visible light and its immobilization[J]. Catalysis Science & Technology, 2018, 8(10): 2578-2587.
- [76] ZHU Q, ZHUANG Y, ZHAO H Q, et al. 2,5-Diformylfuran production by photocatalytic selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural in water using MoS₂/CdIn₂S₄ flower-like heterojunctions[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2023, 54: 180-191.
- [77] ZHUANG Y, ZHU Q, LI G Z, et al. Photocatalytic degradation of organic dyes using covalent triazine-based framework[J]. Materials Research Bulletin, 2022, 146: 111619.
- [78] WU Y Z, SHI J F, LI D L, et al. Synergy of electron transfer and electron utilization *via* metal-organic frameworks as an electron buffer tank for nicotinamide regeneration[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(5): 2894-2905.
- [79] JI X Y, LIU C C, WANG J, et al. Integration of functionalized two-dimensional TaS₂ nanosheets and an electron mediator for more efficient biocatalyzed artificial photosynthesis[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2017, 5(11): 5511-5522.
- [80] BROWN K A, WILKER M B, BOEHM M, et al. Photocatalytic regeneration of nicotinamide cofactors by quantum dot-enzyme biohybrid complexes[J]. ACS Catalysis, 2016, 6(4): 2201-2204.
- [81] HAFENSTINE G R, HARRIS A W, MA K, et al. Conversion of ethanol to 2-ethylhexenal at ambient conditions using tandem, biphasic catalysis[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(11): 10483-10489.
- [82] TEOH W Y, SCOTT J A, AMAL R. Progress in heterogeneous photocatalysis: from classical radical chemistry to engineering nanomaterials and solar reactors[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2012, 3(5): 629-639.
- [83] LUTZ J, MOZHAEV V V, KHMELNITSKY Y L, et al. Preparative application of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase with enzymatic cofactor regeneration in organic-aqueous reaction media[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 19/20: 177-187.
- [84] DÉLÉCOULS-SERVAT K, BASSÉGUY R, BERGEL A. Membrane electrochemical reactor (MER): application to NADH regeneration for ADH-catalysed synthesis[J]. Chemical

- Engineering Science, 2002, 57(21): 4633-4642.
- [85] RUINATSCHA R, BUEHLER K, SCHMID A. Development of a high performance electrochemical cofactor regeneration module and its application to the continuous reduction of FAD[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 103: 100-105.
- [86] KIWI J. Photochemical generation of reduced β -nicotinamide-adenine dinucleotide (induced by visible light) [J]. Journal of Photochemistry, 1981, 16(2): 193-202.
- [87] WIENKAMP R, STECKHAN E. Selective generation of NADH by visible light[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1983, 22(6): 497.
- [88] RODRÍGUEZ-HINESTROZA R A, LÓPEZ C, LÓPEZ-SANTÍN J, et al. HLADH-catalyzed synthesis of β -amino acids, assisted by continuous electrochemical regeneration of NAD⁺ in a filter press microreactor[J]. Chemical Engineering Science, 2017, 158: 196-207.
- [89] ZHAN P, LIU X S, ZHU Q A, et al. Selective furfuryl alcohol production from furfural *via* bio-electrocatalysis[J]. Catalysts, 2023, 13(1): 101.
- [90] TOSSTORFF A, KRONER C, OPPERMAN D J, et al. Towards electroenzymatic processes involving old yellow enzymes and mediated cofactor regeneration[J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(1): 71-76.
- [91] WANG X D, SABA T, YIU H H P, et al. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterogeneous pathways[J]. Chem, 2017, 2(5): 621-654.
- [92] CAHN J K B, WERLANG C A, BAUMSCHLAGER A, et al. A general tool for engineering the NAD/NADP cofactor preference of oxidoreductases[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(2): 326-333.
- [93] ZHAN P, LIU X S, ZHANG S D, et al. Electroenzymatic reduction of furfural to furfuryl alcohol by an electron mediator and enzyme orderly assembled biocathode[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023, 15(10): 12855-12863.
- [94] SON E J, LEE S H, KUK S K, et al. Carbon nanotube - graphitic carbon nitride hybrid films for flavoenzyme-catalyzed photoelectrochemical cells[J]. Advanced Functional Materials, 2018, 28(24): 1705232.
- [95] ZHANG J Z, CAI D, QIN Y L, et al. High value-added monomer chemicals and functional bio-based materials derived from polymeric components of lignocellulose by organosolv fractionation[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2020, 14(2): 371-401.
- [96] JIA Q Q, TENG X N, YU S S, et al. Production of furfural from xylose and hemicelluloses using tin-loaded sulfonated diatomite as solid acid catalyst in biphasic system[J]. Bioresource Technology Reports, 2019, 6: 145-151.
- [97] LI N, ZONG M H. (Chemo)biocatalytic upgrading of biobased furanic platforms to chemicals, fuels, and materials: a comprehensive review[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(16): 10080-10114.
- [98] BOZELL J J, PETERSEN G R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited[J]. Green Chemistry, 2010, 12(4): 539-554.
- [99] VAN PUTTEN R J, VAN DER WAAL J C, DE JONG E, et al. Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources[J]. Chemical Reviews, 2013, 113(3): 1499-1597.
- [100] CARRO J, FERNÁNDEZ-FUEYO E, FERNÁNDEZ-ALONSO C, et al. Self-sustained enzymatic cascade for the production of 2, 5-furandicarboxylic acid from 5-methoxymethylfurfural[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 86.
- [101] KUMAR H, FRAAIJE M W. Conversion of furans by baeyer-villiger monooxygenases[J]. Catalysts, 2017, 7(6): 179.
- [102] KNAUS T, TSELIOU V, HUMPHREYS L D, et al. A biocatalytic method for the chemoselective aerobic oxidation of aldehydes to carboxylic acids[J]. Green Chemistry, 2018, 20(17): 3931-3943.
- [103] SATTLER J H, FUCHS M, TAUBER K, et al. Redox self-sufficient biocatalyst network for the amination of primary alcohols[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(36): 9156-9159.
- [104] VELASCO-LOZANO S, SANTIAGO-ARCOS J, MAYORAL J A, et al. Co-immobilization and colocalization of multi-enzyme systems for the cell-free biosynthesis of aminoalcohols [J]. ChemCatChem, 2020, 12(11): 3030-3041.
- [105] JIA H Y, ZONG M H, ZHENG G W, et al. One-pot enzyme cascade for controlled synthesis of furancarboxylic acids from 5-hydroxymethylfurfural by H₂O₂ internal recycling[J]. ChemSusChem, 2019, 12(21): 4764-4768.
- [106] ZHANG X Y, ZONG M H, LI N. Whole-cell biocatalytic selective oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid[J]. Green Chemistry, 2017, 19(19): 4544-4551.
- [107] PENG B, MA C L, ZHANG P Q, et al. An effective hybrid strategy for converting rice straw to furoic acid by tandem catalysis *via* Sn-sepiolite combined with recombinant *E. coli* whole cells harboring horse liver alcohol dehydrogenase[J]. Green Chemistry, 2019, 21(21): 5914-5923.
- [108] LIAO H X, JIA H Y, DAI J R, et al. Bioinspired cooperative photobiocatalytic regeneration of oxidized nicotinamide cofactors for catalytic oxidations[J]. ChemSusChem, 2021, 14(7): 1687-1691.

- [109] 吴淑可, 周颐, 王文, 等. 从单酶催化到多酶级联催化——从王义翘教授在酶技术领域的贡献说开去[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 543-558.
WU S K, ZHOU Y, WANG W, et al. From single-enzyme catalysis to multienzyme cascade: inspired from Professor Daniel I. C. Wang's pioneer work in enzyme technology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(4): 543-558.
- [110] 汤恒, 韩鑫, 邹树平, 等. 多酶催化体系在医药化学品合成中的应用[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 559-576.
TANG H, HAN X, ZOU S P, et al. Application of multi-enzyme catalytic system in the synthesis of pharmaceutical chemicals[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(4): 559-576.
- [111] CARBALEIRA J D, QUEZADA M A, HOYOS P, et al. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 686-714.
- [112] WACHTMEISTER J, ROTHER D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 169-177.
- [113] ZHANG D X, ONG Y L, LI Z, et al. Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 72: 77-82.
- [114] RAN H, ZHANG J, GAO Q Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN₁[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 51.
- [115] YAN Y X, BU C Y, HUANG X, et al. Efficient whole-cell biotransformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae* NL22[J]. *Journal of Chemical*

Technology & Biotechnology, 2019, 94(12): 3825-3831.

- [116] PUETZ H, PUCHEOVÁ E, VRANKOVÁ K, et al. Biocatalytic oxidation of alcohols[J]. *Catalysts*, 2020, 10(9): 952.



通讯作者: 秦培勇(1976—), 男, 教授。研究方向主要为生物化工和膜分离等。

E-mail: qinpy@mail.buct.edu.cn



通讯作者: 蔡的(1989—), 男, 副教授。研究方向主要为绿色生物制造。

E-mail: caidibuct@163.com



第一作者: 刘庠诗(2000—), 女, 硕士研究生。研究方向为光/电-生物催化生物基平台化合物合成。

E-mail: lxs20000417@163.com