

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-005

化学原理驱动的光生物不对称催化研究进展

付雨¹, 钟芳锐²

(¹ 深圳技术大学药学院, 广东 深圳 518118; ² 华中科技大学化学与化工学院, 生物医用与防护材料湖北省工程研究中心, 生物无机化学与药物湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘要: 手性选择性的调控一直是合成化学的重要研究主题。酶是绿色、高选择性的天然手性催化剂, 但在绿色生物合成中的应用受限于进化形成的分子结构和催化机制, 光催化通过捕获光子能量实现底物分子的化学键活化, 是引发自由基反应的重要策略, 融合光化学和酶的光生物催化正成为不对称催化合成的新兴合成工具。利用蛋白质改造、定向进化等先进分子生物学技术, 基于光化学的化学原理挖掘辅酶的非天然催化功能, 探索光催化剂与酶的协同耦合作用新模式, 理性设计人为定义功能的人工光酶, 能突破天然酶催化的底物谱和反应类型, 有效弥补天然光酶的稀缺性, 拓展生物催化的化学边界和合成空间。本文综述了化学原理驱动光生物催化不对称反应的最新研究进展, 依据光和酶之间的耦合模式和催化机制, 将文献分为外源光催化剂与天然酶耦合、电子供体-受体复合物激发驱动的光酶催化、辅酶直接光氧化还原和光酶能量转移催化四种不同类型, 分别详细探讨其分子活化机制和立体化学调控的化学原理。此外, 本文也对光生物不对称催化存在的辅酶类型单调、催化效率低等挑战进行了总结, 并从天然酶库的深度挖掘、人工光酶类型的拓展、酶的头设计 and 全细胞催化等角度展望了未来的发展方向, 通过化学和生物融合实现高价值功能分子的绿色生物制造, 推动合成化学的可持续发展。

关键词: 光生物催化; 不对称催化; 人工光酶; 定向进化; 手性合成

中图分类号: O62; Q55 **文献标志码:** A

Recent advances in chemically driven enantioselective photobiocatalysis

FU Yu¹, ZHONG Fangrui²

(¹ College of Pharmacy, Shenzhen Technology University, Shenzhen 518118, Guangdong, China; ² Hubei Key Laboratory of Bioinorganic Chemistry & Materia Medica, Hubei Engineering Research Center for Biomaterials and Medical Protective Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, Huazhong University of Science and Technology (HUST), Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: Stereochemical control is an important long-standing research topic in synthetic chemistry. Enzymes, as green and highly selective natural chiral catalysts, face constraints in synthetic applications due to their evolution-

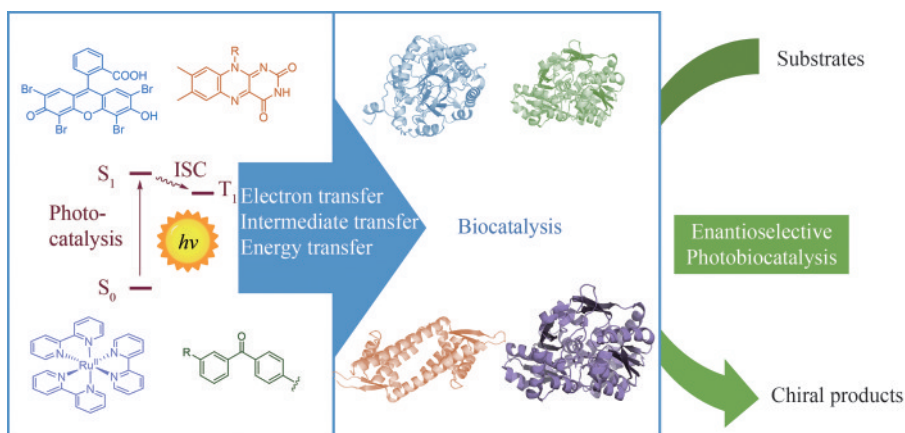
收稿日期: 2024-01-08 修回日期: 2024-03-14

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0903500)

引用本文: 付雨, 钟芳锐. 化学原理驱动的光生物不对称催化研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 1021-1049

Citation: FU Yu, ZHONG Fangrui. Recent advances in chemically driven enantioselective photobiocatalysis [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 1021-1049

defined molecular structure and catalytic mechanism. Photocatalysis represents an important strategy to initiate free radical reactions by capturing photon energy to activate the chemical bonds of substrate molecules. As an emerging synthetic tool for asymmetric synthesis, photobiocatalysis merges the advantages of photochemistry and enzyme. Unfortunately, photoenzymes are rather rare in nature. Thus far photoenzymes identified are DNA photolyases, light-dependent protochlorophyllide reductases and blue light-responsive algal photodecarboxylases. Utilization of advanced molecular biotechnologies such as protein engineering and directed evolution under the guidance of chemical mechanisms of photocatalysis enables us to explore unknown photocatalytic functions of natural coenzymes, synergize photocatalysts and enzymes, and rationally design artificial photoenzyme with defined functions. The past few years have witnessed remarkable advances in these aspects, significantly surpassing the spectrum of substrates and reactions of enzyme catalysis, compensating for the scarcity of natural photo-enzymes and expanding the chemical boundaries and synthetic space of biocatalysis. This review summarizes the latest research progress in chemically-driven photoenzymatic asymmetric reactions. Based on their merging modes, the review categorizes the integration of light and enzyme into four classes: coupling of exogenous photocatalysts and native enzymes, photobiocatalysis driven by excitation of electron donor-acceptor complex, direct photoredox catalysis by coenzymes, and energy transfer photobiocatalysis. The chemical mechanism of bond activation by photocatalysis and synergistic control of stereoselectivity by enzyme in these photobiocatalytic systems are discussed in detail. In the end of this review, we also delineate the present challenges of asymmetric photobiocatalysis including the monotonicity of native photoactive cofactors and low catalytic efficiency for abiological reactions. This review also proposes future directions from the perspectives of new natural enzyme mining, expansion of artificial photoenzymes, enzyme de novo design, and whole-cell catalysis, which are anticipated to foster green bio-manufacturing of high-value functional molecules through the fusion of chemistry and biology and push forward the sustainable development of synthetic chemistry.



Keywords: photobiocatalysis; asymmetric catalysis; artificial photoenzyme; directed evolution; enantioselective synthesis

手性是自然界的基本属性之一，手性化合物在生命过程中发挥着独特的功能^[1-2]。生命体中含有的核酸、蛋白质和糖类等生物大分子都具有手性特征，这使得小分子药物的不同对映体与生物受体之间存在显著不同的识别作用，进而极大影

响其生物活性、毒副作用和临床效果^[3]。此外，手性分子也广泛应用于农药、食品添加剂、化妆品和功能材料等领域^[4-5]。因此，高效、精准地创制单一对映体分子一直是有机合成化学的重要研究课题。不对称催化可以通过亚化学计量催化剂

的手性传递在产物结构中引入一个或多个手性中心,是制备光学活性手性分子的理想方法,是有机合成领域的研究热点之一^[6]。过渡金属催化、有机催化和酶催化已经成为不对称催化手性合成的三大基石性工具。21世纪以来,先后有3次诺贝尔化学奖授予不对称催化合成领域研究的开拓者(2001年^[7]、2018年^[8]和2021年^[9-12])。

随着可持续化学的理念不断深入人心,开发新型绿色不对称催化体系愈发受到关注^[13]。酶是由活细胞产生的一类生物大分子催化剂,可在温和条件下高效、高选择性催化生物体内各种化学反应,是理想的绿色催化剂,早在百年前已被用于有机合成^[14]。然而,天然酶的结构和功能由生命体的生存条件经自然进化选择决定,一般只适用于天然的底物和生化反应,难以满足非天然高值化合物绿色生物合成的多样性需求。近年来,合成生物学、分子生物学和酶工程技术的蓬勃发展极大降低了酶的制备成本,同时也为在分子层面精准重塑蛋白结构提供了便捷可靠的技术。定向进化技术的兴起和发展,极大推动了酶在不对称有机合成领域的应用^[15-16]。酶的定向进化既能优化酶的构效关系,也能创造新的反应性和催化功能。例如,通过定向进化,天然血红蛋白的功能从催化加氧反应拓展至催化卡宾和氮宾转移反应实现C-H的不对称烷基化^[17]和胺化^[18]。从化学视角来看,酶的天然功能主要取决于20种天然氨基酸单体以及与之协同适配的辅酶(辅因子)。定向进化并没有增加氨基酸单体或辅酶的多样性,而这从根本上限制了酶促反应的拓展。在酶的蛋白骨架结构中引入非天然辅因子,是设计新生化反应和发展人工新酶的重要思路。目前已知的人工新酶主要通过金属辅因子的替换、生物定点偶联法或超分子特异性锚定人工辅酶、非天然氨基酸编码人工辅酶等手段来构建,同时结合理性定点突变或定向进化,已经在氧化还原、加成、环化等一系列不对称非天然反应中表现出优异的立体化学调控性能,是当下生物催化研究的热点方向^[19]。

光化学反应通过光子能量的输入实现底物分子的电子能级跃迁进入激发态引发反应,可以解决许多经典热化学难以完成的成(断)键问题,

是和热化学反应并行的有机合成范式。光化学反应具有悠久的历史,早在100多年前,有机化学家 Ciamician^[20]已展示了太阳光促进的光环加成反应。早期的光化学反应主要依赖于紫外光直接激发底物分子,容易带来竞争性副反应。近年来,在可持续化学理念的驱动下,随着金属配合物^[21]、4CzIPN^[22-23]、DPZ^[24]、吡啶盐^[25]、二芳基酮类^[26]等小分子光催化剂的开发和广泛应用,光催化有机合成迎来了蓬勃发展,迅速成为有机化学的研究热点。性能各异的各种光催化剂层出不穷,光催化分子活化模式不断创新,例如光致氧化还原、金属和光协同催化、光致氢转移、能量转移催化等。可见光催化合成的研究越来越强调对反应选择性尤其是立体化学的调控。然而,由于光化学反应主要基于高活性、短寿命的自由基中间体,对映选择性的调控具有显著的挑战,仍是光催化合成领域的难点问题之一^[27]。

光生物催化有效结合了酶促反应精准选择性和光催化丰富反应性两方面的优势,为解决自由基反应手性选择性控制难题提供了理想的工具。然而,天然光酶极其稀少,目前仅发现光裂合酶^[28-29]、原叶绿素酸酯还原酶^[30]及脂肪酸脱羧酶^[31]等寥寥几种。在光催化有机合成化学蓬勃发展的刺激下,同时受益于基因工程、蛋白质工程、酶工程技术等生物技术的发展,融合光催化化学原理和酶催化高选择性调控优势的新型光生物催化逐渐兴起,并在C-C、C-O、C-N等重要成键有机反应中展现出了诱人的应用潜力^[32-33]。

光生物催化有机合成领域的发展十分迅速,已经有相关文献综述^[32-34]。与这些文献不同,本文则将视角专注于光生物催化反应的化学原理和手性诱导,综述光生物不对称催化领域的最新研究进展。根据光和酶的耦合模式和驱动反应的化学原理,将全文分成外源光催化剂与天然酶耦合、电子供体-受体复合物(electron donor-acceptor complex, EDA complex)激发光酶催化、辅酶直接光氧化还原和能量转移光酶催化四个部分(图1)。选取具有手性选择性的代表性文献,讨论和总结催化体系的构建模式、反应机制和立体化学的来源等合成化学关注的问题,并展望光生物催化不对称反应的未来发展方向。

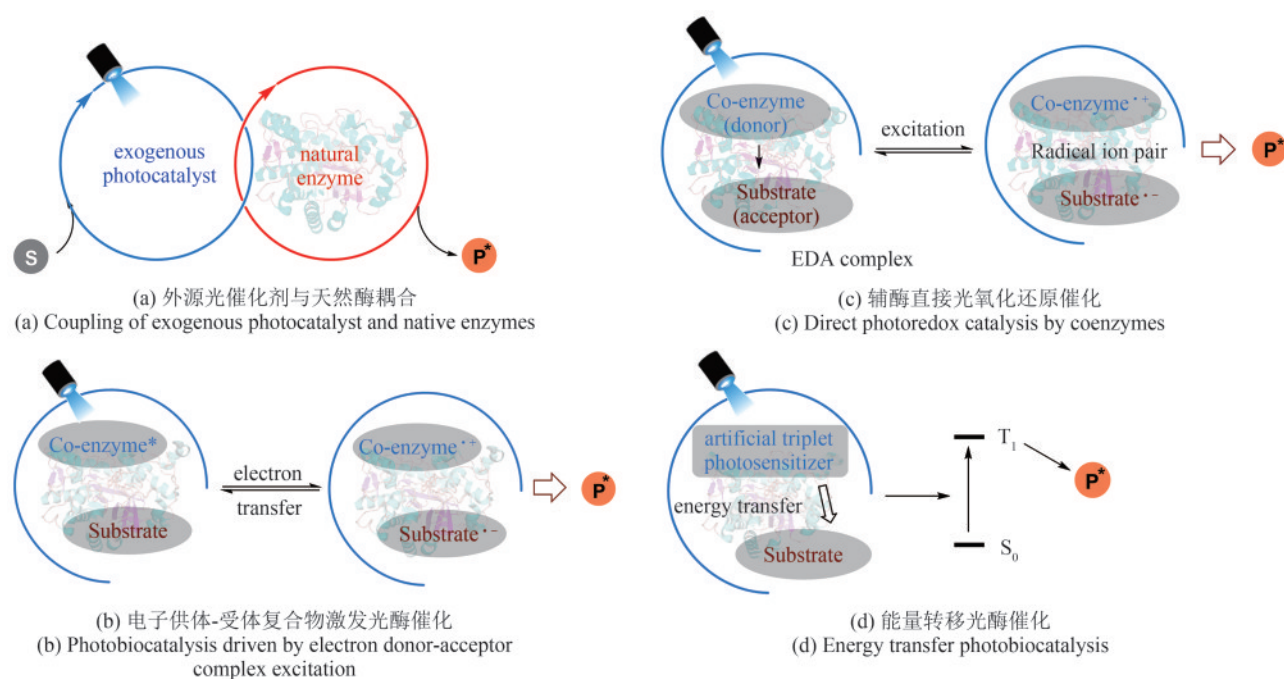


图1 不对称光生物催化的几种主要模式

Fig. 1 The main working modes of asymmetric photobiocatalysis

1 外源光催化剂与酶耦合驱动的不对称生化反应

外源光催化剂和天然酶催化的耦合是构建光生物催化体系较为直接的一种模式，其特点是体系中存在两个协同或串联的催化循环，通常以光催化循环产生的高活性物种为驱动力，通过电子传递或中间体转移来驱动酶催化循环的进行（图2）。此外，外源光催化剂循环也可以生成稳定的中间产物，并作为酶催化的特异性底物发生下一步转化，从而避免了额外的分离纯化步骤，提高了反应的效率。目前已报道有机染料^[35]、纳米材料^[36]、钌（II）和铱（III）配合物^[37]、卟啉类^[38]等光催化剂，生物酶包括单加氧酶、过氧化

物酶等天然酶^[39]。本小节依据光催化剂传递中间物种的不同，分为电子传递促进、自由基中间体传递促进和中间产物传递促进的酶促反应三个部分展开讨论。

1.1 电子传递促进的酶促反应

光催化剂一般具有较为优异的光物理和光化学活性，通常比底物分子具有更长的吸收波长和更大的消光系数，更容易受光激发，进而提升其氧化还原性质与底物分子发生电子或能量转移。电子转移介导的光致氧化还原已成为光催化最常见的机理之一。氧化还原酶也普遍存在于生命体内，一般以价态可变的金属或非金属分子为辅酶

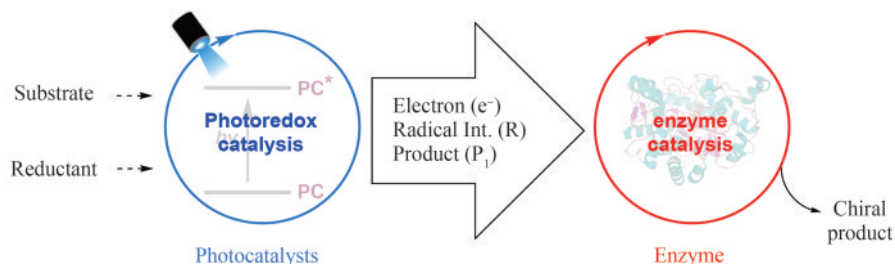


图2 外源光催化剂与酶催化耦合驱动的不对称生化反应

Fig. 2 Enzyme-photosensitizer coupled systems catalyzed asymmetric biochemical reactions

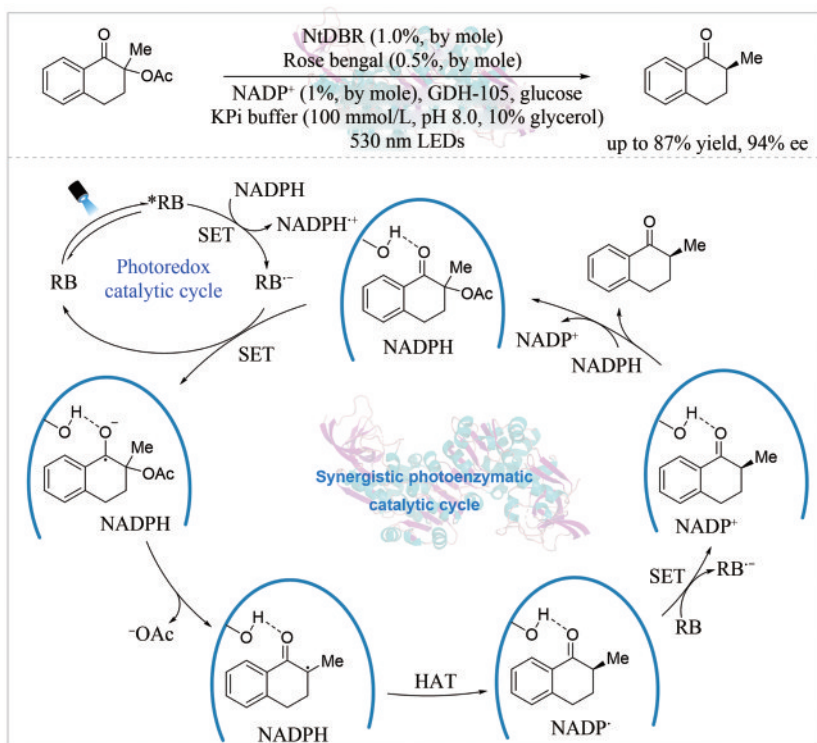
(辅因子), 而这些天然酶的催化循环需要另外的级联系统提供电子实现辅因子的再生。例如, 烯炔还原酶黄素天然辅因子催化过程中需要消耗辅因子 NADPH, 形成的 NADP⁺ 在葡萄糖/葡萄糖脱氢酶 (GDH) 级联系统的催化下原位再生 NADPH^[40]。将外源光催化剂的氧化还原循环作为电子供体泵与天然氧化还原酶耦合, 能使用非天然的牺牲还原剂, 改变天然酶的电子传递链并强化反应的驱动力。例如, Paul 和 Park 等^[41] 设计了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 的一系列人工类似物辅因子, 能与具有光氧化还原活性的氮掺杂碳纳米点 (N-CD) 组合, 实现光驱动的天然老黄酶 (old yellow enzyme, OYE) 催化烯炔不对称还原反应。从合成化学角度看, 这类光生物催化体系虽然重构了电子供给链, 但并没有改变氧化还原酶的性质, 所催化的反应依旧是基于酶天然的功能。相比之下, 将光催化和氧化还原酶的底物和反应杂泛性拓展相结合, 则为开发全新的光生物催化不对称反应提供了机会。

2018 年, Hyster 课题组^[42] 发展了 Rose Bengal (RB) 和烟酰胺依赖型烯炔还原酶 NtDBR 协同催化的不对称自由基脱乙酰氧和脱卤反应。RB 的激发态具有强氧化性 ($E_{1/2}^{\text{red}}[\text{RB}^{\bullet}/\text{RB}^{\ominus}] = +0.81 \text{ V}$, 能将辅酶 NADPH 单电子氧化而生成还原性物种 RB[•]。另外, 还原酶通过空腔内氨基酸残基与 α -乙酰氨基酮类底物的氢键作用形成缔合态, 提高了底物的氧化电势, 从而适配 RB[•] 的还原性发生单电子转移, 促使乙酰氧根阴离子脱离后生成 α -羰基碳自由基中间体。该中间体是在蛋白的手性空腔中原位生成, 通过 NADPH 的对映选择性氢转移 (hydrogen atom transfer, HAT) 生成手性还原产物和 NADP⁺, 光学纯度高达 94% ee。NADP⁺ 与 RB 通过单电子转移反应生成还原性阴离子自由基 RB[•] 和 NADP⁺, 后者由葡萄糖脱氢酶 GDH/葡萄糖的级联催化再生还原型辅酶 NADPH [图 3(a)]。进一步探究表明, 该体系也可催化 α -溴酰胺的不对称自由基脱卤氢化。该策略通过引入外源性光氧化还原催化剂捕获光子能量, 从而打破氧化还原过程电子传递的热力学能垒, 拓宽了天然烯炔还原酶的底物杂泛性, 展示了光驱动下天然氧化还原酶催化新生化反应的巨大潜力, 后也被证明该策略

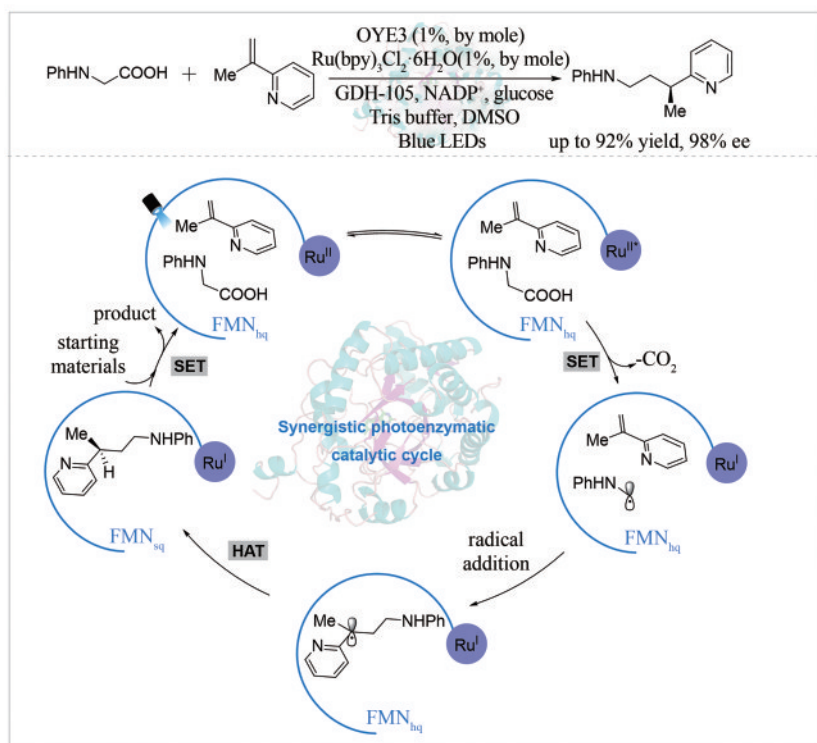
同样适用于乙烯基吡啶类^[43] 和酮类^[44] 底物的对映选择性还原。

上述体系中, 激发态的光催化剂先从黄素或烟酰胺类辅酶获得一个电子生成还原性物种, 后通过电子转移还原蛋白空腔内的氧化型底物分子。除了这一路径, 激发态的光催化剂也可以将还原型底物直接单电子氧化生成活性自由基引发后续的不对称加成反应。基于这一思路, 近期, Hyster 课题组^[45] 将外源性光氧化还原催化剂 Ru(bpy)₃Cl₂ 与烯炔还原酶结合, 发展了氨基酸与乙烯基吡啶的氧化还原中性脱羧偶联, 以最高达 92% 的产率及 98% ee 实现了高对映选择性脱羧烷基化反应 [图 3(b)]。该文作者研究表明, Ru(bpy)₃Cl₂ 被吸附结合至蛋白空腔内, 受光激发发生单电子转移促使氨基酸发生脱羧氧化, α -氨基自由基与乙烯基吡啶反应经自由基加成生成苄基自由基, 而随后与还原型辅酶 FMN_{hq} (flavin mononucleotide hydroquinone) 发生氢原子转移。该步骤是立体选择性决定步骤, 这得益于 FMN_{hq} 在蛋白空腔内具有专一性的结合位点和空间取向。

氮自由基是一种高活性和丰富反应性的中间体, 可以通过各种前体化合物便捷地生成, 可用于氢氨基化、C-H 氨基化和氢原子攫取反应, 在含氮化合物的合成中具有重要的应用价值^[46-47]。然而, 由于氮自由基容易发生快速的攫氢反应, 而相比之下形成 C-N 键则是一个动力学更慢的过程, 这给发展氮自由基的选择性胺化反应带来了显著的挑战。同时, 基于氮自由基的胺化反应还存在着立体化学调控的难题。2023 年, Hyster 课题组^[48] 利用外源性 Ru(bpy)₃Cl₂ 和黄素依赖型烯炔还原酶 YqjM (ene-reductase from *Bacillus subtilis*) 的协同催化, 首次实现了光生物催化分子内不对称氢胺化反应。这一新生化反应由 Ru(bpy)₃²⁺ 的三重态激发态被辅因子 FMN_{sq} 单电子还原引发, 生成的 Ru(bpy)₃⁺ 将电子传递至羧酯底物分子, 促使后者脱去苯甲酸阴离子形成氮自由基。氮自由基与分子内的烯炔经历 6-endo-trig 环化形成苄基自由基中间体, 后夺取黄素辅因子结构中的氢原子, 最终实现分子内不对称氢胺化反应 (图 4)。通过定向进化改造酶空腔, 所获得的不同突变体可实现除 6-endo-trig 外的 5-exo-trig、7-endo-trig 及 8-endo-trig



(a) 不对称自由基脱乙酰氧反应
(a) Enantioselective radical deacetylation reaction



(b) 不对称氧化还原中性脱羧偶联
(b) Asymmetric redox-neutral decarboxylative coupling reaction

图3 外源光催化剂和天然酶电子传递介导协同催化

Fig. 3 Synergistic catalysis with exogenous photocatalysts and native enzymes via electron transfer

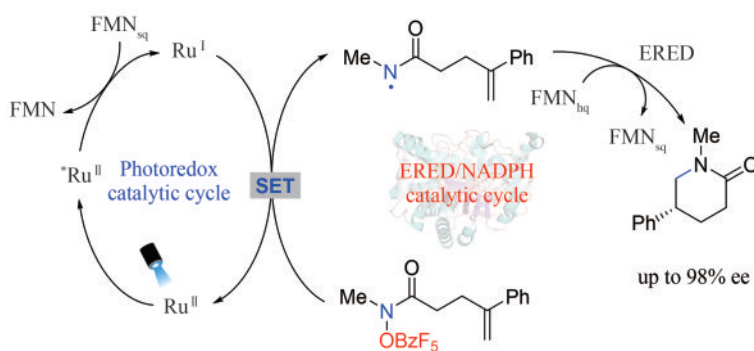


图4 光生物催化不对称分子内氢胺化反应

Fig. 4 Photobiocatalytic asymmetric intramolecular hydroamination reaction

分子内环化反应。此外，当使用烯炔还原酶 GluER (ene-reductase from *Gluconobacter oxydans*) 时，该作者还成功实现了分子间不对称氢胺化反应。

电子传递介导的酶促反应突破了酶受限于其天然催化活性的局限性，通过加入外源性光催化剂可有效扩展其催化功能。虽然这一策略在一定程度上受光催化剂与蛋白之间电子转移速率的限制，但对于天然酶的反应性和功能性扩展具有重要意义。

1.2 自由基中间体传递促进的酶促反应

光催化和酶催化耦合的另一种方式是通过活性自由基中间体的传递。2023年，Yang 和 Liu^[49] 合作报道了有机染料 Rhodamine B (RhB) 和 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 依赖型色氨酸合成酶光-酶协同催化策略，实现了三氟硼酸钾盐与 β -羟基- α -氨基酸的不对称自由基 C-C 偶联反应，以优异的区域选择性和立体选择性制备了一系列不含保护基的高附加值多手性中心非天然氨基酸 (图5)。在光催化循环中，RhB 受光激发后进入激发态，促进烷基三氟硼酸盐底物发生单电子氧化生成烷基自由基中间体。与此同时，色氨酸合成酶则通过已知 PLP 辅酶催化途径将丝氨酸和其他 β -羟基- α -氨基酸转化为亲电性氨基丙烯酸酯。两活性中间体在色氨酸合成酶的空腔发生 C-C 自由基加成生成氮杂烯丙基自由基中间体，该步骤是产物立体化学决定步骤。随后经历电子转移/质子转移 (ET/PT) 或质子耦合电子转移 (PCET) 及水解获得目标氨基酸产物。值得强调的是，PLP 辅酶在游离状态与 RhB 的组合并不能表现

出反应活性，这说明蛋白的空腔对亲电性氨基丙烯酸酯活性中间体的形成和加成反应的选择性至关重要。这一协同催化策略的特点是光催化剂和酶分别活化不同的底物并通过活性自由基中间体进行耦合，使得反应的活性不再简单依赖于光催化剂光化学性质与酶空腔缔合的底物之间的严格适配，具有更大的调控空间。该反应不仅为构建一系列连续多手性中心的非天然氨基酸提供了全新的策略，也为光-酶协同催化探索未知的新反应体系及新型不对称自由基催化反应体系的研究提供了一种新思路。

近期，黄小强、梁勇和田长麟^[50] 合作报道了有机染料 Eosin Y 和焦磷酸硫胺素 (thiamine diphosphate, ThDP) 依赖型酶的协同光生物催化新体系，通过蛋白质工程将 ThDP 依赖的苯甲醛裂解酶改造为自由基酰基转移酶 (RAT)，并将其用于芳香醛与邻苯二甲酰亚胺活性酯之间的不对称自由基酰化反应。ThDP 是一类广泛存在于生命体的辅酶，通过亲核催化机理促使亲电性酰基前体化合物形成亲核性碳负-烯胺中间体，即 Breslow 中间体，从而与各种亲电试剂发生碳碳键偶联反应^[51]。在合成化学中，ThDP 可用于催化经典的安息香缩合反应。这些反应通常是双电子离子型反应，Breslow 中间体的立体选择性单电子反应的研究较少^[52]，而在酶催化反应中尚未见报道。该文章作者基于光催化剂和关键中间体氧化还原电势的理性分析，利用激发态 Eosin Y 对 Breslow 中间体的单电子氧化形成活性自由基阴离子，通过与邻苯二甲酰亚胺活性酯单电子还原生成的烷基自由基偶合，实现了高对映选择性自由基-自由基偶联

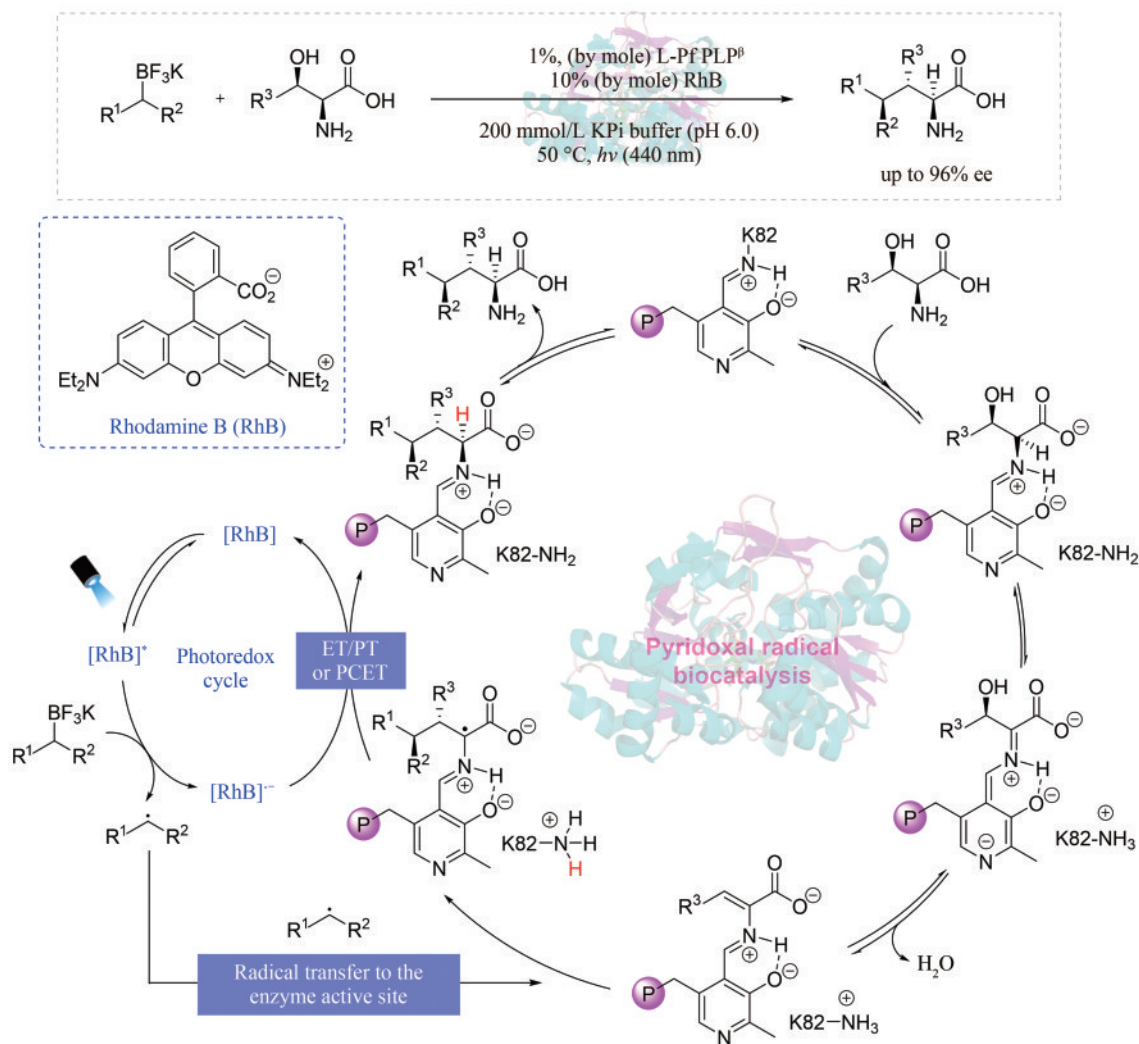


图5 光催化剂-色氨酸合成酶协同催化构建非天然氨基酸

Fig. 5 Stereoselective unnatural amino acid synthesis by synergistic catalysis with photocatalyst and tryptophan synthetase

反应 (图6)。该研究首次将 ThDP 依赖型天然酶改造用于催化非天然自由基偶联反应, 且催化剂负载量和立体选择性效果明显优于小分子有机氮杂环卡宾催化, 底物的普适性也显著优于天然酶, 扩展了天然酶的催化功能, 为光-酶协同催化的新反应发展和自由基反应的手性控制提供了新思路。

1.3 中间产物传递介导的酶促反应

光催化和酶催化还可以通过稳定中间产物的传递进行耦合。相比较于电子传递及自由基中间体传递驱动的酶促反应, 中间产物传递介导的酶促反应一般以酶的天然底物专一性和催化功能为基础。光催化与酶催化步骤相对独立但互相兼容,

一般不涉及酶催化热力学的改变。目前报道较多的接力模式是光生中间产物参与后续酶催化反应, 充分发挥酶的底物专一性和高对映选择性优势以实现重要手性分子的制备。例如, 周少林等^[53]报道了 Ir(III)-硫醇和脂肪酶三元协同催化的脂肪胺动态动力学拆分酰胺化反应, 利用 Ir(III)-硫醇的光催化单电子转移促进脂肪胺外消旋化, 将脂肪酶 Novozym 435 不适配的构型底物转化为其识别的相反构型, 从而实现全部底物的对映选择性转化。

2018 年, 赵惠民和 Hartwig^[54]合作报道了 $[Ir(dmppy)_2(dtbbpy)]PF_6$ 或 FMN 与烯烃还原酶协同催化立体汇聚式碳碳双键不对称还原 [图 7(a)]。受激发后的光催化剂可通过能量转移活化使 Z 型烯烃转化为 E 型烯烃分子, 烯烃还原酶选择性

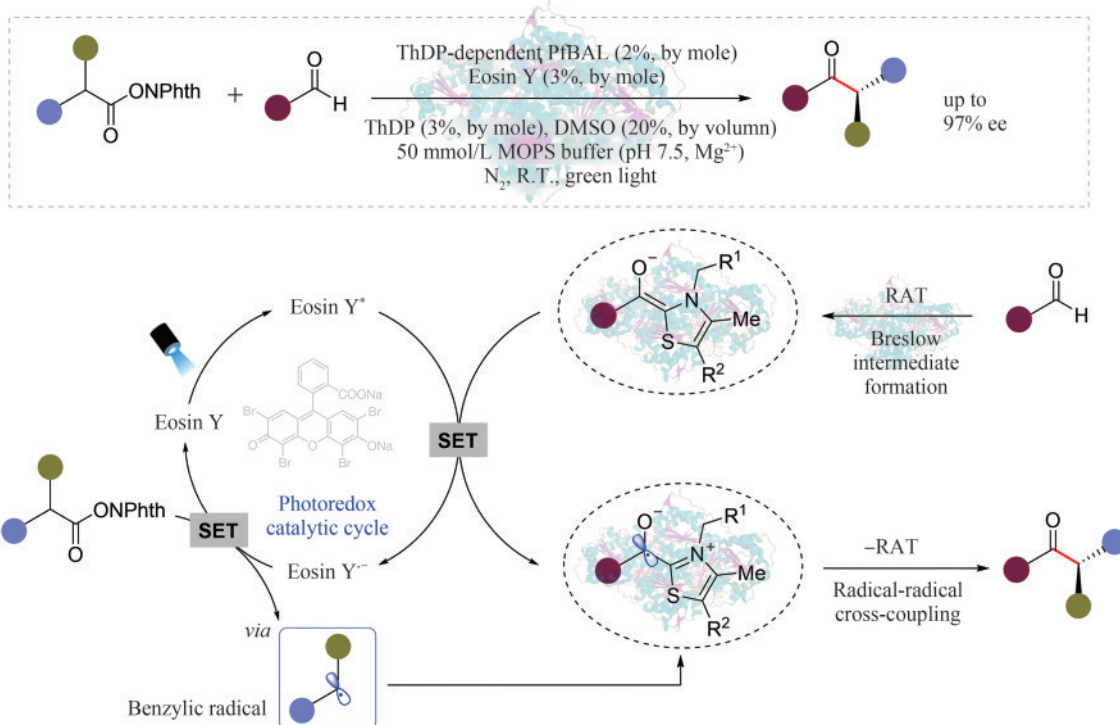


图6 光催化剂-苯甲醛裂解酶协同催化自由基偶联反应

Fig. 6 Synergistic catalysis with photocatalyst and benzaldehyde lyase for radical-radical coupling reaction

识别 *E* 型烯烃，进而催化其不对称碳-碳双键直接还原，实现了顺反烯烃异构体混合物的不对称还原，并以高产率、高选择性催化合成了包括巴氯酚、菲尼布特在内的药物及生物活性分子手性前体的合成。2020年，赵惠民教授课题组^[55]进一步使用乙二胺四乙酸等作为牺牲还原剂，无需还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH）即直接实现了光催化烯烃 *E/Z* 异构化与烯烃还原酶的高效协作催化不对称还原。

2019年，何延红和官智小组^[56]报道了金属光催化剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ 与小麦胚芽脂肪酶（wheat germ lipase, WGL）接力催化吲哚与酮的对映选择性氧化交叉偶联反应用于合成手性吲哚酮 [图7(b)]。首先， $\text{Ru}(\text{II})$ 光催化剂在氧气环境下催化 2-苯基吲哚的过氧化反应生成 3-假吲哚过氧化氢中间体，脱水转化为强亲电性亚胺酮中间体。该中间体具有一定的稳定性，可进入 lipase 活性空腔并被残基催化三联体 Asp(或 Glu)-His-Ser 活化形成质子化亚胺离子，同时 lipase 活性空腔可活化酮形成烯醇阴离子，通过亲核进攻亚胺离子中间体生成

手性吲哚酮，该步骤是反应的立体化学决定步骤。值得一提的是，上述吲哚亚胺中间体和酮亲核试剂并非脂肪酶的天然底物，但其催化三联体能够通过氢键作用活化酮的烯醇异构化，且无需天然辅酶的参与，这展示了天然脂肪酶的功能杂泛性，为新反应的设计和发展提供了启发。

2020年，MacMillan 和 Hyster 课题组^[57]合作研究以 $[\text{Ir}(\text{dF}(\text{CF}_3)\text{ppy})_2(\text{dtbbpy})]\text{PF}_6$ 为光氧化还原催化剂，酮还原酶 *Lk-ADH* (*Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase) 为酶催化剂，在胺及硫醇催化剂存在条件下实现了外消旋 β -取代酮的动力学拆分还原，制备了一系列单一构型的 γ -取代醇化合物 [图7(c)]。反应的过程如下：胺催化剂与底物的酮羰基缩合反应生成烯胺中间体，被受光激发的 Ir 光催化剂氧化为烯胺自由基阳离子，再经历去质子化后形成 5π 电子烯胺自由基中间体。随后该自由基中间体与亲电性硫醇催化剂发生非立体选择性的氢转移过程回到原料或其对映体，由此实现了底物的消旋化。体系中的酮还原酶以 NADPH 为氢源，将 *R*-构型羰基化合物选择性还原为双手性中心醇，*S*-构型羰基化合物则继续参与反

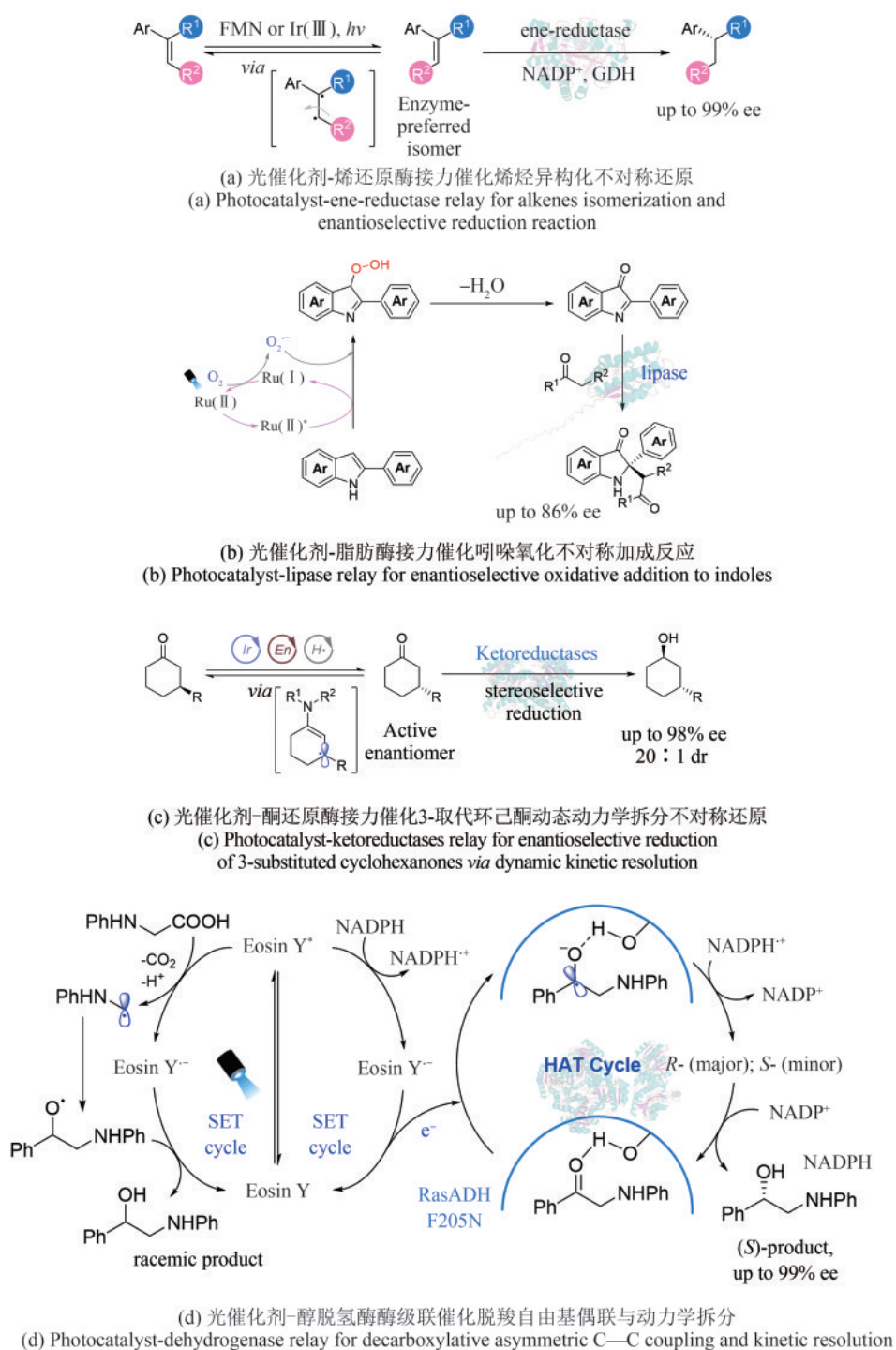


图7 中间产物传递介导的不对称光生物催化

Fig. 7 Asymmetric photobiocatalysis mediated by intermediate product transfer

应循环逐渐被消耗，最终得到单一构型的取代环己醇类化合物。该策略具有良好的普适性，可与转氨酶及醇脱氢酶其他类型酶匹配，并可用于药物分子LNP023的合成。通过光氧化还原催化使得

手性立体中心消旋化，并与酶催化体系结合合成特定构型的 γ -取代醇（胺），突破了静态和动态立体中心的传统定义，为更多类型的光-酶协同不对称催化构建非天然反应体系提供了新思路。近期，

朱敦明、吴洽庆团队^[58]以 Eosin Y 作为光催化剂, *Ralstonia* sp. 细菌的脱氢酶 RasADH 为酶催化剂, 高效、高立体选择性合成了一系列取代手性 1,2-氨基醇产物 [图 7(d)]。激发态曙红 Y 光催化剂可通过单电子转移直接实现 *N*-芳基甘氨酸和醛的高效脱羧自由基偶联。光催化和酶催化两个循环以生成的外消旋氨基醇化合物为媒介接力, 在 RasADH 催化下以最高达 99% ee 值生成 *S*-构型手性 1,2-氨基醇产物。该策略无需外源添加辅酶循环体系即可实现脱羧自由基偶联与去消旋化过程的高效协作, 为自由基偶联反应与生物活性分子合成途径的结合提供了思路。近期, Borowiecki 等^[59]以 9-芴酮作为光催化剂, 来自红球菌的醇脱氢酶为酶催化剂, 高效、高立体选择性实现了仲醇类化合物的去外消旋化, 以最高达 92% 的产率及 99.9% ee 值生成手性醇类化合物。该策略以氧气作为氧化剂实现仲醇的氧化, 醇脱氢酶则催化原位生成的羰基化合物转化为手性醇类化合物。

基于中间产物传递的光-酶协同催化的优点在于减少分离和纯化步骤, 简化操作并提高反应效率。另外, 还能通过优化两个催化循环的动力学来控制中间产物的浓度, 这有时候能避免中间产物的过量积累而影响酶活。例如, 过加氧酶能催化 H_2O_2 促进的 C-H 键对映选择性羟基化, 但高浓度 H_2O_2 容易导致酶的辅基结构的分解而降低酶活。Hollmann 等^[60]以 Au-TiO₂ 为光催化剂, 与重组过加氧酶 *rAaeUPO* 耦合构建协同光生物催化体系实现了乙苯的选择性羟基化制备光学活性 *R*-苯乙醇。Au-TiO₂ 能将甲醇和氧气可控地转化原位生成 H_2O_2 并保持合适的浓度, 从而避免 *rAaeUPO* 催化过程中被高浓度

H_2O_2 降解, 保持了较高的活性和酶稳定性。

化学光催化与酶催化的耦合体系具有简单、灵活的特点, 已被应用于多种不同类型有机反应及酶催化剂, 产物往往能获得优异的手性选择性。由于耦合体系中催化剂之间的电子、自由基中间体、中间产物的转移速率主要是基于热运动, 对整体反应效率有显著影响, 因此如何提高催化剂之间介质的传递效率是该策略需要重点关注的问题。

2 电子供体-受体复合物激发驱动的不对称反应

EDA 复合物形成于缺电子的电子受体和富电子的电子供给体之间的偶极-偶极相互作用。电子供给体通常为含孤对电子的化合物或富 π 电子的化合物, 电子受体常见于缺电子的杂环、卤代烃等。当这两种分子相遇时, 产生较长波长的显著吸收峰。在相应波长的光照下, 电子发生转移分别形成自由基阳离子和自由基阴离子两个活性物种, 是重要的光化学自由基反应引发策略 [图 8(a)]^[61]。2013 年, Melchiorre 等^[62]报道了手性仲胺催化脂肪醛与烷基卤代物之间的对映选择性 α -烷基化反应, 其关键步骤是手性仲胺与醛缩合生成富电子烯胺与卤代烃之间形成 EDA 复合物, 在光照条件下发生电荷转移生成芳基和烯胺自由基正负离子对, 前者脱去卤素负离子生成烷基自由基与后者发生不对称碳碳键形成反应 [图 8(b)]。EDA 复合物激发催化的特点是不依赖催化剂自身的吸收, 而与催化剂和底物的电子密度有关。形成的 EDA 复合物的吸收往往在可见光

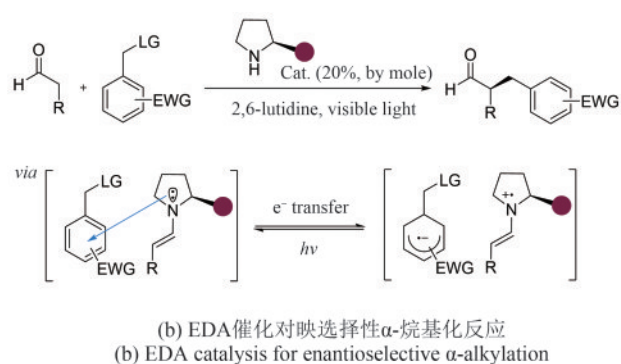
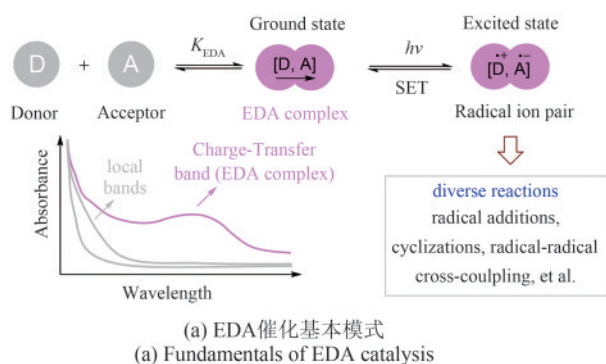


图 8 EDA 催化

Fig. 8 EDA catalysis

区, 因此可以在十分温和的条件下发生反应, 克服了底物和催化剂本身需要在紫外区激发的限制。

EDA 光催化通过电子供体-给体的独特电子转移机制实现温和条件下的光生自由基的形成, 极大推动了自由基合成化学的发展, 新型 EDA 催化反应模式不断见诸报道^[63]。烯炔还原酶一般以黄素或烟酰胺为辅因子, 该辅因子的还原态可与缺电子底物形成 EDA 复合物。近年来, 基于此 EDA 复合物激发驱动的光生物催化不对称反应得到了持续的发展^[64]。本小节依据 EDA 复合物激发驱动的光生物催化不同反应类型, 分为卤代羰基化合物的不对称脱卤还原、烯炔的不对称氢烷基化、 $C(sp^3)-C(sp^3)$ 的不对称偶联、烯炔的不对称烷基基化四个部分进行综述。

2.1 α -卤代羰基化合物的不对称脱卤还原

2016年, Hyster 等^[65]首次报道了烟酰胺依赖型短链脱氢酶 LKADH 在可见光条件下催化 α -卤代内酯类化合物的不对称自由基脱卤氢化反应 [图 9(a)]。机理研究表明, α -卤代内酯可与烟酰胺辅因

子 NADPH 形成 EDA 复合物, 可见光照下碳卤键从 NADPH 获得一个电子发生裂解生成 α -烷基自由基并离去卤素负离子, 该自由基中间体从辅因子 NADPH⁺ 中夺取氢原子而终止反应。由于 EDA 的形成和氢转移都发生在酶的手性空腔中, 反应的立体选择性决定步骤为 NADPH⁺ 的氢转移, 因此该反应具有优异的对映选择性和较好的底物普适性, 以 81% 产率及 96% ee 值生成不对称自由基脱卤氢化产物。该文作者通过使用另一种脱氢酶 RasADH, 获得了对映选择性相反的氢化产物。该研究揭示了烟酰胺依赖的脱氢酶具有与其天然催化功能完全不同的反应性, 具有开创性的意义。2022年, 吴起、徐鉴等^[66]报道了一种黄素依赖型环己酮单加氧酶 CHMO (cyclohexanone monooxygenase) 催化的光化学不对称自由基脱卤氢化反应, 将 α -卤代- α -氟代酮转化为光学活性的氟代酮 [图 9(b)]。该策略通过理性聚焦迭代点突变策略构建了突变体库, 筛选获得的最佳突变体能以 99% 产率及 98% ee 值获得目标产物。作者通过模拟计算提出了 α -碳自由基的氢化步骤是通过电子转移/质子转移机制 (ET/PT) 分别从辅酶和溶剂中获得电子和质

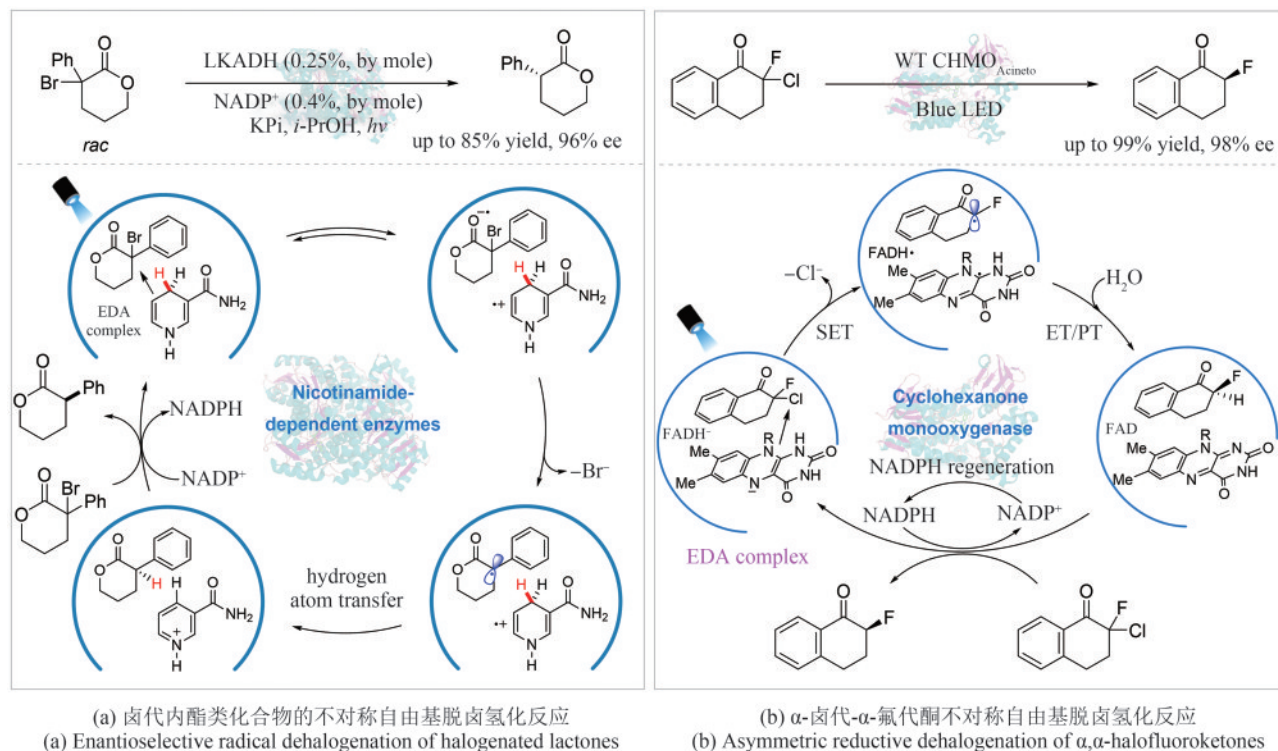


图9 卤代羰基化合物的不对称脱卤还原

Fig. 9 Asymmetric reductive dehalogenation of halogenated carbonyl compounds

子完成的，这与 Hyster 等提出的不对称 HAT 过程有显著的不同。

2.2 烯烃的不对称氢烷基化

在上述烟酰胺或黄素依赖型光酶的 EDA 催化反应中， α -碳自由基常常以氢转移作为反应的终止步骤。当周围有烯烃反应物时，碳自由基有可能发生对不饱和碳碳键的自由基加成，生成新的碳自由基再发生氢化。基于这一思路，2019 年，Hyster 等^[67]进一步发展了黄素依赖型烯烃还原酶（ene-reductases）催化的可见光下分子内不对称自由基环化反应，以高达 99% 的产率和 98% ee 值选择性合成了一系列五、六、七和八元环内酰胺

[图 10(a)]。该反应中，黄素辅酶与 α -氯酰胺底物分子形成 EDA 复合物，光照条件下发生电荷转移生成碳自由基，该自由基可与分子内烯烃加成形成内酰胺自由基中间体，再夺取黄素分子上的氢原子完成分子内烯烃的不对称氢烷基化生成 β -手性内酰胺产物。随后，赵惠民等^[68]将该策略拓展至更具挑战的分子间反应。他们利用烯烃还原酶催化实现 α -卤代羰基化合物与末端烯烃的不对称自由基氢烷基化反应，以高达 99% 的产率及 99% ee 值合成了一系列 γ -手性羰基化合物 [图 10(b)]。机理研究表明， α -卤代羰基化合物可与黄素辅因子（FMN⁻）形成电子供体-受体复合物（EDA complex），在可见光激发下通过单电子转移脱卤可生成 α -羰基自由基。 α -羰基自由基对烯烃加成，后

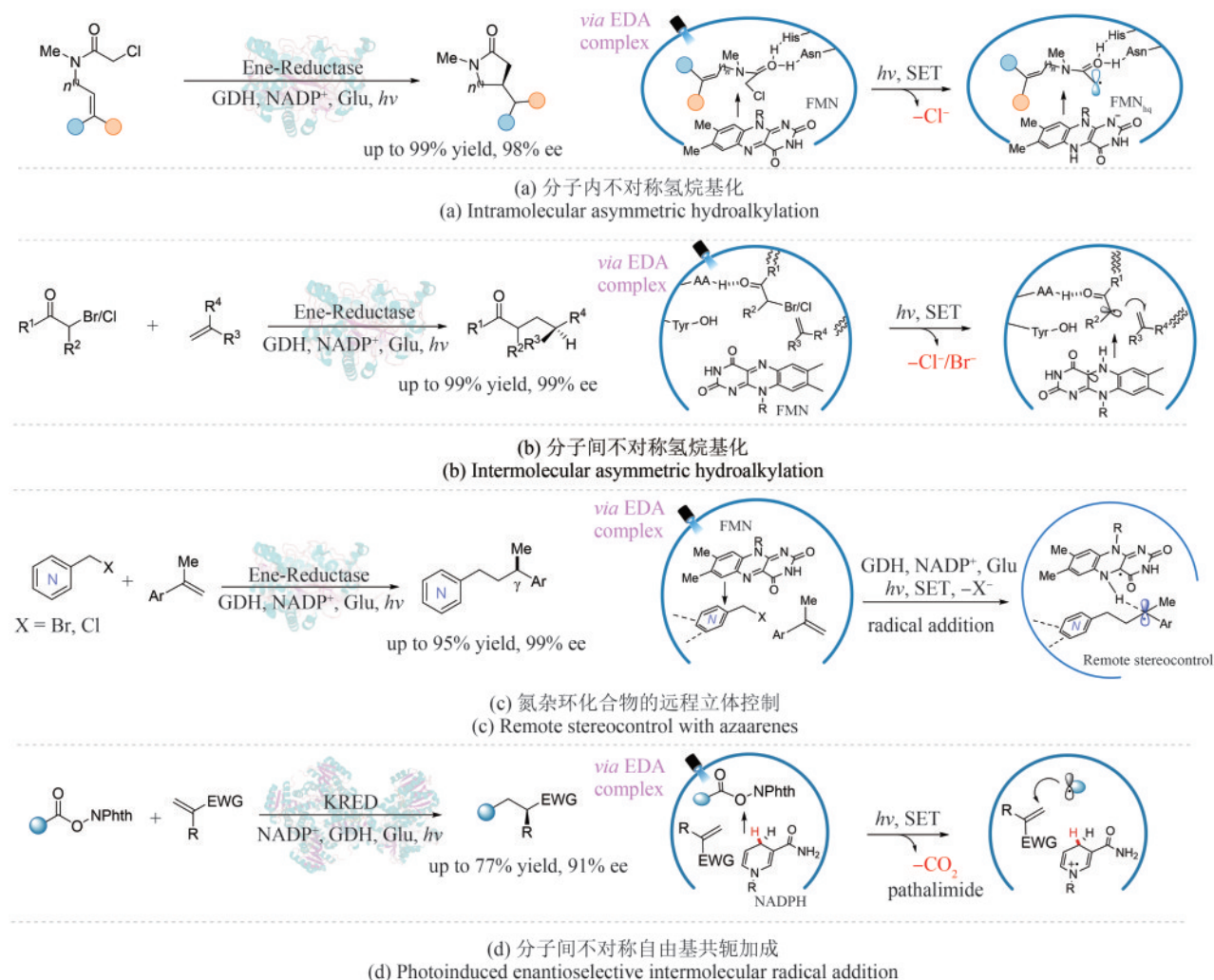


图 10 烯烃的光生物催化不对称氢烷基化

Fig. 10 Asymmetric photobiocatalytic hydroalkylation of alkenes

以极高的立体选择性从黄素辅酶中夺氢完成不对称氢烷基化。最近,赵惠民等^[69]还报道了烯炔还原酶催化氮杂芳烃上的远端碳中心自由基的对映选择性反应。他们以溴甲基氮杂芳烃和 α -甲基苯乙烯类分子为底物,利用酶活性空腔的不对称环境有效控制氮杂芳烃中超过六个化学键或超过0.6 nm自由基中心的手性,以高达95%的产率及99% ee值构建了一系列具备 γ 立构中心的氮杂芳烃[图10(c)]。机理研究表明,天然辅因子FMN_h和底物溴甲基氮杂芳烃两者之间可形成EDA complex,复合物被可见光激发后经单电子转移形成氮杂苄基自由基,氮杂苄基自由基随后与 α -甲基苯乙烯加成形成自由基中间体,该中间体经氢原子转移生成目标产物,反应选择性控制步骤为手性氢原子转移,烯炔还原酶活性空腔内残基产生的氢键和空间效应对选择性的控制至关重要,通过对酶活性空腔的改造可实现氮杂芳烃远程立体中心的高效控制。

除了 α -卤代羰基类底物,其他类型的缺电子底物如邻苯二甲酰亚胺活性酯也能与还原型辅酶形成EDA复合物。2022年,赵惠民教授课题组和王斌举教授课题组^[70]合作报道了一种新型光酶催化分子间不对称自由基加成反应,以最高达91%的ee值成功合成一系列 α -羰基取代手性化合物[图10(d)]。该策略以 N -羟基邻苯二甲酰亚胺酯为自由基前体,经半理性聚焦迭代点突变构建酶库并筛选得到最佳酮还原酶KRED突变体。自由基前体可与KRED活性空腔中的NADPH辅因子形成

EDA复合物,可见光照射下自由基前体基团离去后形成自由基,该自由基与 α 位取代吸电子基的末端烯炔加成后经历立体选择性的氢原子转移(HAT)生成目标产物。近期,饶义剑教授团队^[71]通过对黄素依赖型烯炔还原酶GluER的定向进化改造,以高达99%的产率及99% ee值实现了一系列手性苯并含氧杂环化合物的不对称合成。该研究中黄素与底物分子可形成EDA复合物,其在可见光激发下经单电子转移脱卤形成自由基,该自由基与分子内烯炔加成后经历选择性氢原子转移高效合成手性苯并氧杂萘酮、色满酮和茛酮类化合物,为光酶催化合成药物活性分子手性骨架提供了一种新途径。

2023年,徐鉴和贾义霞^[72]合作研究以黄素依赖型烯炔还原酶为催化剂,重氮化合物为自由基前体,以高达95%的产率及96% ee实现了 α -甲基苯乙烯的不对称自由基氢烷基化,发展了一种光酶催化构建手性碳碳键的新策略[图11(a)]。该策略通过体系中形成的EDA复合物在可见光激发下的单电子转移实现重氮自由基前体的活化,离去氮气分子形成自由基,与 α -甲基苯乙烯加成并发生立体选择性加氢烷基化实现手性碳碳键的构建。该研究将重氮化合物引入光酶催化体系,进一步丰富了光生物催化可适配反应类型。近期,徐鉴教授课题组^[73]进一步将苯磺酰氯引入光酶催化体系,报道了一种自由基介导的黄素依赖型烯炔还原酶催化立体选择性氢磺酰化反应,以高达92%的产率及98% ee值合成了一系列 β -磺酰基

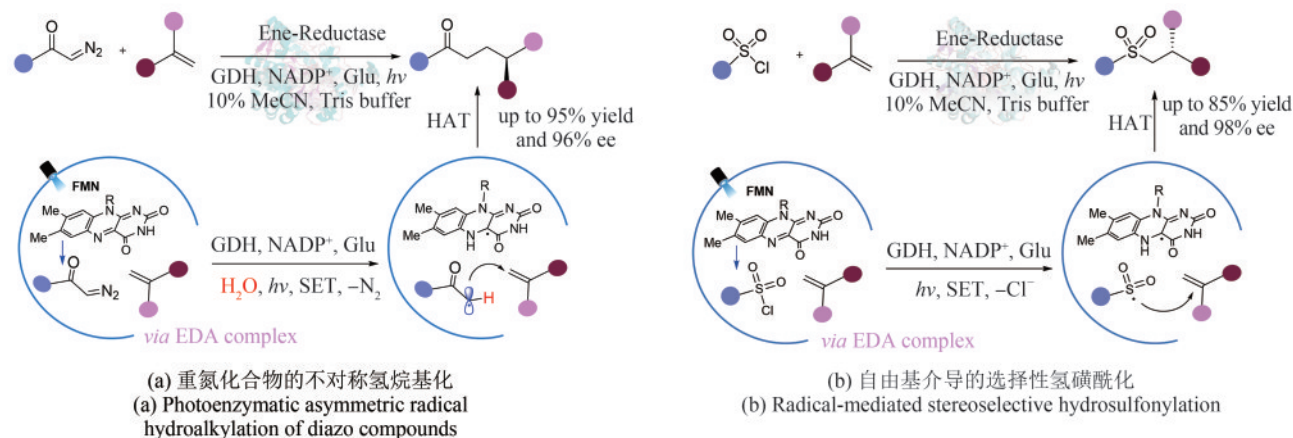


图11 光酶催化不对称自由基氢烷基化

Fig. 11 Photoenzymatic asymmetric radical hydroalkylation

手性砜化合物 [图 11(b)]。机理研究表明, 该策略通过辅因子黄素与苯磺酰氯形成EDA复合物, 苯磺酰氯获得电子后形成苯磺酰自由基, 苯磺酰自由基与末端烯烃加成后经立体选择性氢原子转移实现选择性氢化磺酰化反应合成手性砜。

2.3 烯烃的不对称羟基基化

在上述光酶EDA复合物催化烯烃的氢烷基化反应中, 最终碳自由基都是以氢转移中止得到还原型产物, 这主要得益于 FMN_{sq} 的N-H较弱的键能(58 kcal/mol, 1 kcal=4.2 kJ)^[74]。最近, Hyster等^[74]通过筛选和突变黄素依赖型烯烃还原酶, 建立了碳自由基的氧化中止模式, 从而顺利地将光酶EDA复合物催化策略扩展至烯烃的不对称羟基基化反应。他们以 α -卤代羰基化合物及 α -甲基苯乙烯类分子作为底物, 黄素依赖型烯烃还原酶MorB (morphinone reductase from *Pseudomonas putida*)作为光酶, 以高达95%的产率及90% ee值合成了一系列手性叔醇类化合物(图12)。机理研究表明, 反应通过黄素辅因子与 α -卤代羰基形成的EDA复合物在光照下发生单电子转移引发, 烷基自由基中间体随后与末端烯烃加成形成苄基自由基, 后被 FMN_{sq} 单电子氧化形成苄基碳正离子, 被水捕获后生成手性叔醇类化合物。由于羟基化是

反应的对映选择性决定步骤, 该步骤的手性诱导比氢转移还原中止具有更大的挑战。尽管该文作者对MorB进行多轮定向进化, 部分产物的ee值仍在中等水平。

2.4 $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-C}(\text{sp}^3)$ 的不对称偶联

除了以烯烃类底物作为自由基加成的反应伙伴外, 光酶EDA复合物策略也可以用于 $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-C}(\text{sp}^3)$ 的不对称亲电试剂交叉偶联。2022年, Hyster教授课题组^[75]报道了以 α -卤代羰基化合物和硝基烷烃作为反应底物组合的光酶催化非天然偶联反应策略, 在可见光激发下以最高达98%的产率及98% ee值实现了 α -卤代羧酸衍生物与硝基烷烃之间的 $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-C}(\text{sp}^3)$ 亲电试剂交叉偶联, 扩展了光酶催化的反应类型(图13)。两种亲电试剂的立体选择性交叉偶联对过渡金属催化也具有显著的挑战。在该光生物催化系统中, 尽管亚硝酸盐更容易还原, 但由于 α -氯酰胺具有与 FMN_{sq} 形成EDA复合物的独特能力, 还原过程具有选择性。在可见光激发下, α -卤代羰基底物发生单电子还原产生自由基中间体, 后与质子化硝基烷烃加成后生成硝基阴离子自由基中间体。随后, 该自由基断裂C-N键脱去亚硝基阴离子并生成烷基自由基, 烷基自由基通过立体选择性氢原子转移得到

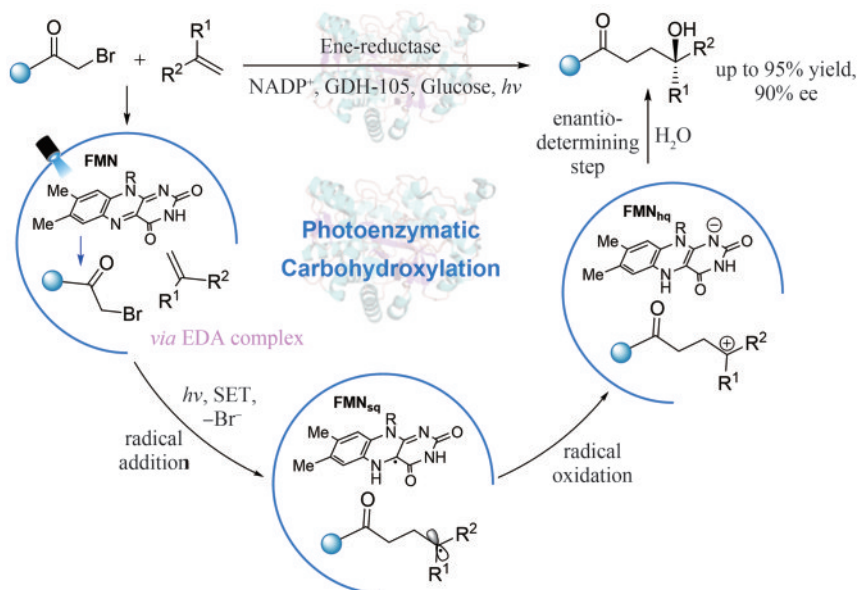


图12 烯还原酶的EDA催化烯烃不对称羟基基化

Fig. 12 Asymmetric carbohydroxylation of alkenes via EDA catalysis with ene-reductase

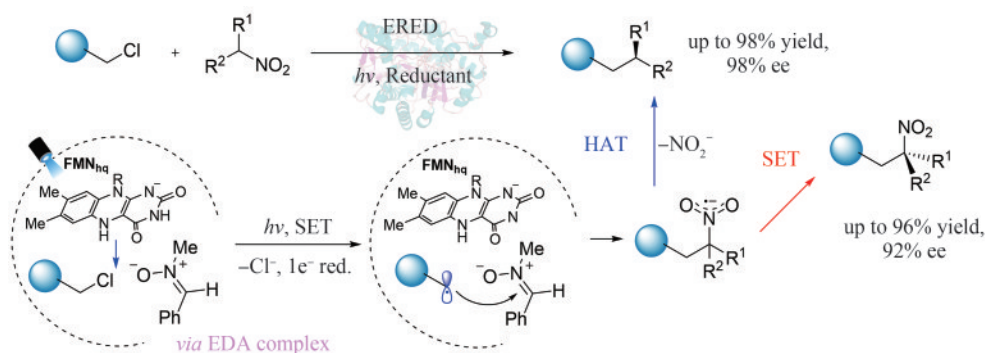


图13 光酶EDA催化 $C(sp^3)-C(sp^3)$ 不对称亲电试剂交叉偶联

Fig. 13 Asymmetric $C(sp^3)-C(sp^3)$ cross-electrophile coupling catalyzed by photoenzyme EDA

最终手性交叉偶联产物。研究表明,适当提高反应缓冲液的pH有助于提高收率,该文作者认为这是因为pH增大条件下提高了活性亚硝酸盐物种的浓度。在此基础上,2023年Hyster教授课题组^[76]进一步实现了高化学选择性和对映选择性的硝基烷烃C-烷基化反应,以最高达96%的产率及92% ee值合成得到一系列手性三级硝基化合物。与上述脱硝基亲电试剂交叉偶联反应不同的是,作者通过对*Geobacillus kaustophilus*来源的OYE进行突变得到了三级突变体*GkOYE-G7*,能在反应环境中促使硝基阴离子自由基中间体发生单电子氧化。机理研究证实, α -氯代酰胺、质子化硝基烷烃和黄素辅因子(FMN_{hd})可形成四元EDA复合物,随后经历单电子还原、自由基选择性加成及单电子氧化生成目标产物。

表1总结了目前已报道的EDA复合物激发驱动的光酶催化不对称反应的主要案例,EDA光催

化策略显著拓宽了光酶不对称催化可适用反应类型,展示了天然酶的非天然光催化活性。虽然到目前为止的例子都基于黄素和烟酰胺两类天然辅酶作为EDA复合物中的电子供体,但合成化学EDA催化方向研究的不断深入推进也给光酶催化受体类型的拓展带来启发,反应类型也得到了极大丰富。显然,EDA复合物激发驱动的光生物催化已经成为一类典型的酶促非天然底物分子活化模式,并具有广阔的发展空间和应用前景。另外,其他天然辅酶、辅酶中间体或非天然辅酶在EDA催化中的应用则有待挖掘。

3 辅酶光氧化还原直接驱动的酶促不对称反应

EDA激发光酶催化策略极大拓展了天然黄素

表1 EDA复合物激发驱动的光酶催化不对称反应总结

Table 1 Summary of photoenzymatic asymmetric reactions driven by EDA complex excitation

反应类型	作者/年份	酶的类型	参考文献
α -卤代羰基化合物的不对称脱卤还原	Emmanuel/2016	烟酰胺依赖型短链脱氢酶 LKADH	[65]
	Peng/2022	黄素依赖型环己酮单加氧酶 CHMO	[66]
烯烃的不对称氢烷基化	Biegasiewicz/2019	黄素依赖型烯烃还原酶 GluER	[67]
	Huang/2020	黄素依赖型烯烃还原酶 OYE1	[68]
	Li/2023	黄素依赖型烯烃还原酶 OYE1	[69]
	Huang/2022	烟酰胺依赖型酮还原酶 KRED	[70]
	Zhu/2023	黄素依赖型烯烃还原酶 GluER	[71]
	Duan/2023	黄素依赖型烯烃还原酶 OYE1	[72]
	Chen/2023	黄素依赖型烯烃还原酶 OYE1	[73]
烯烃的不对称羟基化	Ouyang/2023	黄素依赖型烯烃还原酶 MorB	[74]
不对称 $C(sp^3)-C(sp^3)$ 亲电试剂偶联	Fu/2022	黄素依赖型烯烃还原酶 CsER	[75]
	Fu/2023	黄素依赖型烯烃还原酶 <i>GkOYE</i>	[76]

及烟酰胺依赖型烯炔还原酶的非天然光催化活性，但这一策略要求底物须与辅因子形成EDA复合物，这对辅因子与底物之间的电荷匹配有较高的要求，一般是缺电子性底物，这一定程度限制了这一策略的普适性。黄素是一种广泛存在于天然酶中的氧化还原辅因子，在天然酶催化中一般以基态形式参与热化学反应。实际上，由于其多环共轭的分子结构，黄素本身具有较好的光物理性质，在400~520 nm左右的可见光区域有显著的吸收，450 nm处消光系数^[77]可达11 300 L/(mol·cm)。激发态的黄素表现出更强的氧化还原性质(FADH₂^{*}, $E_{1/2}^* = -2.26$ V vs. SCE)^[78]。如前所述，虽然目前已知的天然光酶屈指可数，但巧合的是，自然进化却在大多数情况下选择了黄素或者烟酰胺作为光活性的辅酶。最古老的光酶是DNA光裂合酶^[79]，是一种黄素依赖型酶，负责修复DNA中的嘧啶环丁烷二聚体。在这一反应中，还原型黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅因子(FAD_{sq}⁻)作为光催化剂通过单电子转移还原引发嘧啶二聚体[2+2]逆反应，后由FAD_{sq}对产生的自由基负离子进行氧化^[80-81]。本节将讨论黄素和烟酰胺依赖型直接受光激发引发底物的单电子氧化或还原不对称自由基反应。

3.1 CvFAP催化

2017年，Beisson课题组在研究小球藻(*Chlorella variabilis*)产烃过程中发现一种新的脂

肪酸光脱羧酶(fatty acid photodecarboxylase, CvFAP)。CvFAP可吸收蓝光催化长链脂肪酸脱羧生成烷烃或烯烃，其底物活性空腔大小决定了十六碳、十七碳脂肪酸转化效率最高(图14)^[31]。之后的详尽机理研究表明，CvFAP晶体结构显示其含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)，FAD可被蓝光激发进入激发态(FAD^{*})，激发态FAD^{*}夺取脂肪酸分子的电子形成FAD⁻，脂肪酸底物则形成相应烷基自由基，后从FAD⁻反向夺取电子，通过精氨酸给质子生成产物烷烃^[82]。

此后，脂肪酸光脱羧酶CvFAP备受关注，CvFAP催化各种转化不断被报道。2019年Hollman课题组^[83]通过加入烷烃分子占据催化空腔，进一步提升了CvFAP催化短链脂肪酸脱羧效率，拓宽了CvFAP的底物适用范围。2021年，吴起课题组^[84]报道了工程化CvFAP催化羧酸类底物的脱羧氘代。该策略使用氘水作为氘源且无需外源性硫醇添加剂，以高产率和高氘代率成功制备多种氘代化合物。同年，他们还报道了工程化CvFAP选择性催化反式脂肪酸脱羧，展示出顺式和反式脂肪酸分离的新思路^[85]。Scrutton课题组^[86]则报道了使用含工程化CvFAP的活细菌将生物质和工业废物中的脂肪酸脱羧转化为丙烷。近期，吴淑可教授与Bornscheuer教授^[87]合作开发了一种非天然三酶级联生物催化体系，一锅法将苯丙氨酸转化为乙苯，通过对光脱羧酶CvFAP进行结构引导的半理性突变获得的突变体可将产率提高6.3倍，由此建立的双细胞催化体系能以82%的收率将L-苯

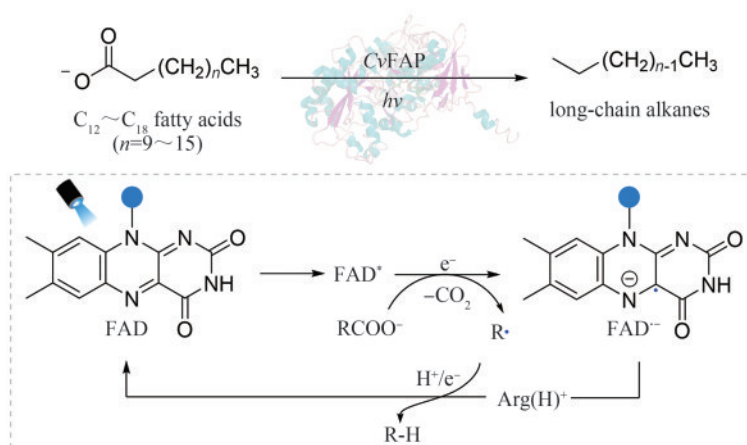


图14 天然脂肪酸光脱羧酶催化脱羧反应

Fig. 14 Natural fatty acid photodecarboxylase catalyzed decarboxylation

丙氨酸转化为乙苯，进一步将串联反应与发酵体系结合，可由生物基甘油一锅法生产乙苯。

在不对称催化方面，2019年，吴起课题组^[88]报道了首例工程化 CvFAP 催化对映选择性反应的例子，通过 CvFAP 催化 α -氨基酸和 α -羟基酸的动力学拆分，以最高达 99% 的 ee 值制备了一系列 α -羧酸手性化合物 [图 15(a)]。作者通过晶体结构引导蛋白质工程策略扫描活性空腔内残基，以此缩小辅因子与底物结合空腔，进而使得光照激发后的黄素辅因子 FAD 更易与 S 构型羧酸盐发生单电子转移脱羧，而 R 异构体则无法发生，由此实现 α -羧酸手性化合物的制备。该策略无需辅因子 NADPH 的参与及预处理底物。最近，吴起、王志国、徐维华等^[89]利用集中理性迭代定点突变 (focused rational iterative site-specific mutagenesis, FRISM) 策略进一步改造 CvFAP，获得的高度立体互补变体可有效实现草酸酯或草氨酸光驱动动力学拆分，以最高达 99% 的 ee 值实现手性仲醇或胺的制备。古阳、周佳海、高锦明^[90]的合作研究通过工程化 CvFAP 实现了仲羧酸和叔羧酸的光酶催化直接脱羧，也可催化 α 取代羧酸的光驱动动力学拆分 [图 15(b)]。分子动力学模拟实验表明，突变体 G2 可有效提高羧酸盐与辅因子 FAD 之间的

电子转移效率，且能有效识别 S 构型底物分子实现脱羧及其动力学拆分。该研究扩展了 CvFAP 催化动力学拆分可适用底物范围及其潜在应用空间，为工程化 CvFAP 催化构建手性骨架及生物活性分子提供了合成工具。

3.2 烯烃还原酶催化

激发态黄素除了直接与还原性底物发生单电子转移实现底物的氧化生成活性自由基中间体外，也可从外源性牺牲还原剂夺取单电子形成 FMN_{sq}^- ， FMN_{sq}^- 将电子传递至氧化性底物分子形成自由基阴离子活性中间体并引发后续反应。2020年，Hyster 团队^[91]使用黄素依赖型烯烃还原酶作为催化剂，Tricine 作为牺牲还原剂，实现了光生物催化 α -卤代酰胺的还原脱卤环化，以最高达 97% 的产率及 96% ee 合成了一系列手性羟吲哚化合物 (图 16)。该反应的机理如下：黄素在光照激发下从 Tricine 获取单电子，后传递电子给 α -卤代酰胺底物分子，促使卤素负离子离去形成羰基 α -碳自由基中间体，该自由基中间体与分子内的苯环发生立体选择性环化加成。蛋白的手性环境赋予这一步自由基加成反应优异的手性选择性，是反应

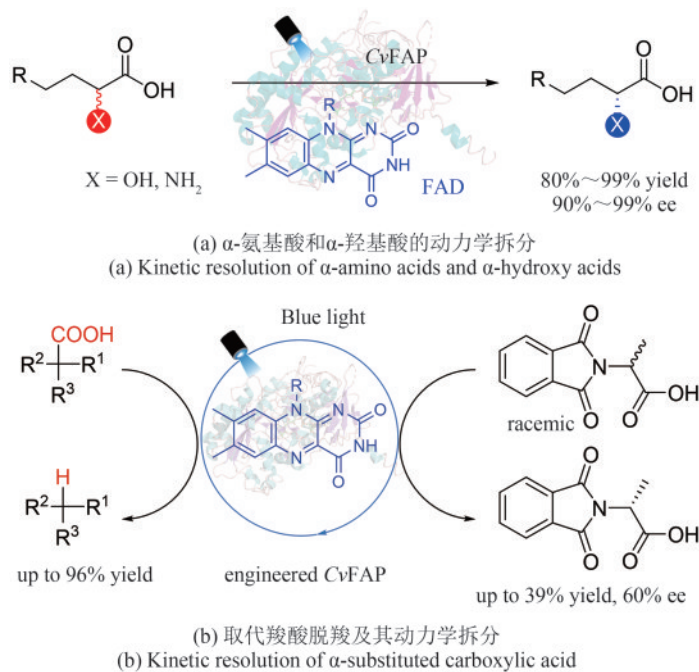


图 15 CvFAP 催化动力学拆分

Fig. 15 CvFAP catalyzed kinetic resolution

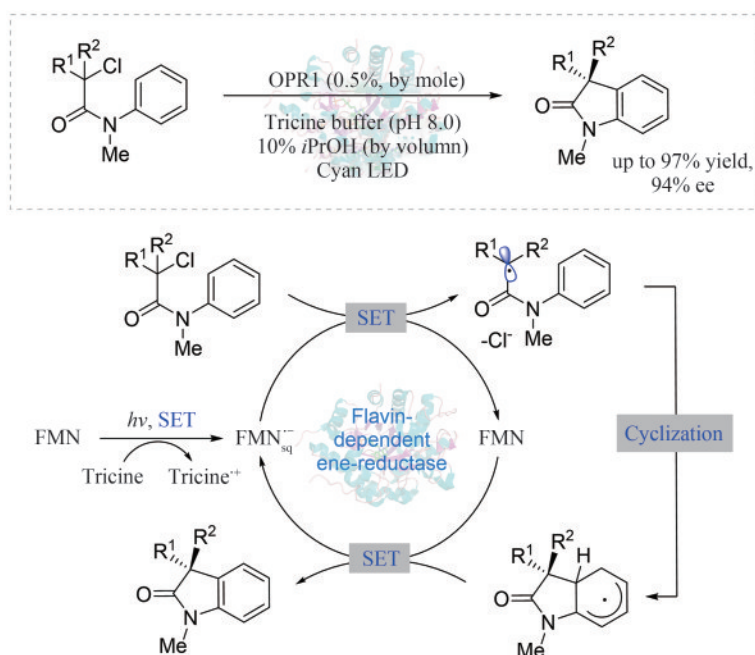


图16 黄素依赖型烯炔还原酶催化还原脱卤环化

Fig. 16 Flavin-dependent ene-reductases catalyzed asymmetric radical hydrodehalogenations

的立体化学决定步骤。生成的去芳构化自由基中间体则在 FMN 的氧化下失去电子得到芳构化的光学活性吲哚酮化合物。该策略展示了一种天然光酶催化非天然反应的全新机制，提供了一种 $C(sp^3)-C(sp^2)$ 的不对称自由基偶联新策略。FMN 在催化循环中发挥了氧化剂和还原剂的双重功能，这与前述的很多体系中 FMN 的氢原子转移催化机制有显著的不同。

2020年，Hyster等^[92]报道了一例烯炔还原酶 ERED 催化的丙烯酰胺立体选择性还原反应（图17）。丙烯酰胺与 ERED 的天然底物相似，却无法通过天

然机制还原，作者预计这类底物可以被 ERED 识别限制在活性位点上。通过筛选，OYE1 表现出最好的对映选择性，通过添加外源 FMN 进一步提高了 OYE1 的产率，位点饱和突变得得到变体 OYE1-F269G 能获得 100% 收率和 80% ee。该反应由激发态 FMN_{sq} 促使丙烯酰胺烯炔的单电子还原引发，产生苄基羰基 α -自由基阴离子和中性 FMN_{sq} 。自由基阴离子的质子化形成稳定的 α -酰基自由基，可以通过来自 FMN_{sq} 的 HAT 生成还原产物。氘取代实验证实了机理中的质子化步骤，在氧化缓冲液中进行反应时， β 位点的氘化程度为 90%。然而，在

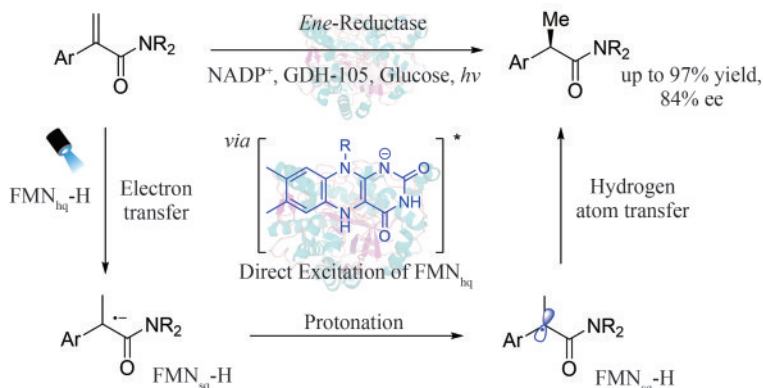


图17 直接激发黄素辅因子催化烯炔的不对称氢化

Fig. 17 Direct excitation of flavin dependent ene-reductases for asymmetric hydrogenation

使用氘代葡萄糖进行反应时, α 位点的氘化程度较低, 这表明FMN_{sq}中N5-H键的酸化作用带来明显的氘洗脱。这一直接激发机制也可以用于还原裂解C-F键。该策略扩展了黄素依赖型烯烃还原酶可还原的非天然烯烃类底物分子, 推动了酶催化杂泛性的进一步发展。最近, 黄小强和王斌举等^[93]利用烯烃还原酶实现了一系列环状和开链烯胺的不对称还原, 提供了一种替代过渡金属催化氢化的绿色生物合成方法。

近期, 黄小强、王斌举和田长麟^[94]合作报道了烯烃的不对称自由基氢芳基化反应。该反应以黄素依赖型烯烃还原酶为催化剂, 通过可见光直接激发黄素辅因子实现反应, 以最高达99%的产率及98% ee值制备了一系列手性氢芳基化产物(图18)。机理研究表明, 烯烃还原酶黄素辅因子被激发后形成激发态FMN_{ox}^{*}, 在蛋白活性空腔内

氧化富电子芳烃形成芳基自由基阳离子。该中间体可与空腔内末端烯烃加成, 生成前手性自由基中间体, 随后该自由基中间体经历电子和质子(或氢原子)转移生成目标手性氢芳基化产物。该策略展示了一种新型氧化还原中性催化循环, 通过可见光直接激发黄素蛋白, 激发态黄素引发底物的单电子氧化及自由基加成, 显著拓展了烯烃还原酶的催化模式和在不对称合成中的应用。近期, 叶俊涛、丁蓓、戴少波^[95]的合作研究以黄素依赖型的烯还原酶(GluER)作为酶催化剂, 报道了一例单电子氧化引发的光酶催化策略, 以最高达90%的产率及98% ee值合成了一系列手性砜类化合物。该策略利用芳基或烷基亚磺酸钠盐为自由基前体, 磺酰基自由基中间体与烯烃加成后形成前手性自由基中间体, 该自由基中间体随后经历氢原子转移实现非环状烯烃的对映选择性氢磺酰化反应。

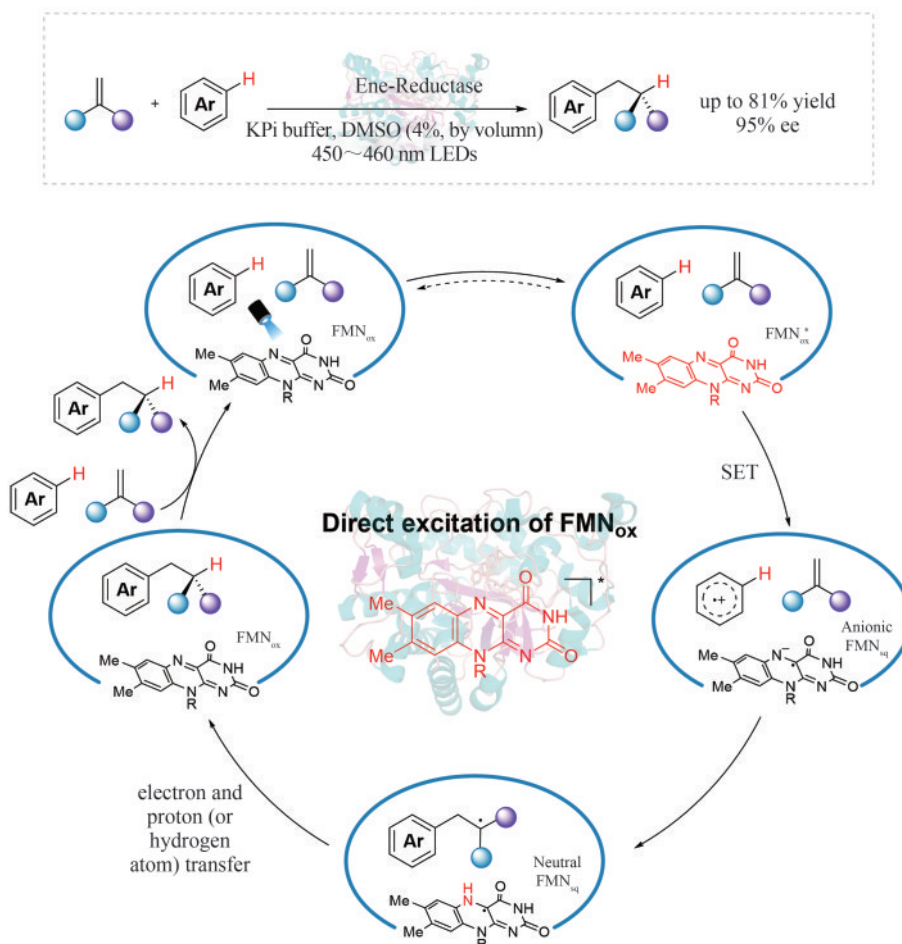


图18 黄素依赖型烯烃还原酶催化烯烃的不对称自由基氢芳基化反应

Fig. 18 Flavin-dependent ene-reductases catalyzed asymmetric radical hydroarylation of alkenes

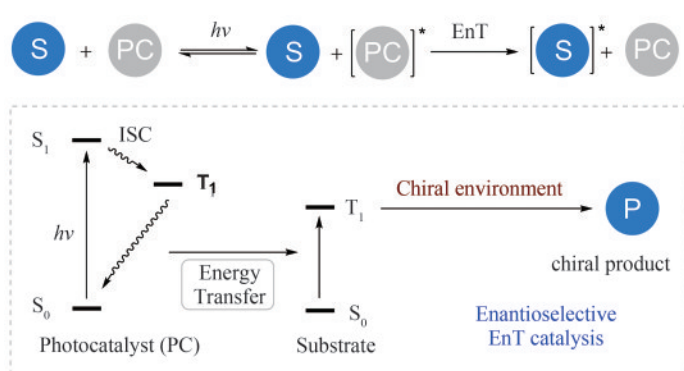
4 能量转移驱动的酶促不对称反应

受光激发的光催化剂分子，既可以与底物发生电子转移引发氧化还原反应，也可以通过电子的交换（Dexter 能量转移机制）激发底物进入三重态而引发反应，即能量转移催化（energy transfer, EnT）。能量转移催化为各种具有挑战性的光化学反应提供了一种温和和高效的合成策略^[96-97]，目前已被用于 [2+2] 环加成^[98]、电环化^[99]、去消旋化^[100]等多种光化学合成反应。能量转移反应一般依赖于优异的三重态光敏剂（PC），具有较高的系间窜越（ISC）效率和较高的三重态（ T_1 ）能量。由于对称性禁阻的原因，三重态的寿命比单重态（ S_1 ）长，因而可以通过 EnT 促使邻近的底物从基态（ S_0 ）进入三重态而自身回到基态。底物分子的三重态具有很高的能量，一般可以认为后续的反应能快速自发完成而不需要额外的活化能 [图 19(a)]。因此，上述化学原理使得三重态反应的立体选择性调控要求保证 EnT 的过程在手性环境中发生，也就是说要将底物提前与手性催化剂络合。目前已报道的对映选择性能量转移催化的体系主要有手性小分子-光敏剂协同催化和手性光敏剂超分子催化两种策略。例如，Yoon 小组^[101]报道了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3[\text{PF}_6]_2$ 和手性 PyBox-Sc 协同催化 2-羟基查耳酮与二烯及苯乙烯的不对称分子间 [2+2] 反应 [图 19(b)]。Sc³⁺ 与 2-羟基查耳酮的配位可有效降低其三重态能

量（从约 54 kcal/mol 到约 33 kcal/mol），从而有效克服游离底物的背景反应。Bach 课题组利用含有内酰胺的分子骨架设计的手性二芳基酮光催化剂，可通过底物与光催化剂之间的氢键相互作用，催化内酰胺或酰胺类底物的高对映选择性 [2+2] 环加成^[102]、aza Paternò-Büchi 反应^[103]、去消旋化^[104]等能量转移反应 [图 19(b)]。能量转移作为一种重要的活化机制，其效率非常依赖于底物和催化剂的邻近性；建立两者特异性和空间导向性的分子识别是该过程手性诱导的一种有效思路，而次级键作用作为一种重要的手段，还往往能引起底物三重态能量的降低。目前已知的催化剂往往需要底物中有特殊的导向基团。相比较于小分子手性催化剂，酶骨架可通过氢键、 π - π 堆积、疏水相互作用等非共价相互作用诱导底物，有望提供一种普适性更好的手性调控工具。然而，目前已知的天然光酶或光化学辅酶，都是通过光致电子转移活化底物。能量转移催化活性机制在天然酶催化中尚未见报道，需要依赖于人为理性设计引入三重态光敏剂构建人工酶。

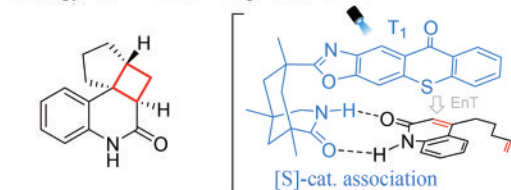
基因密码子拓展技术（genetic code expansion）是一种在蛋白中引入非天然氨基酸的方法^[105-106]。在经典的遗传密码中，生物体的蛋白质合成是通过核酸序列编码的 20 种天然氨基酸完成的，64 个密码子编码了 20 种氨基酸和终止密码子。遗传密码扩展使用正交的氨基酰基-tRNA 合成酶（aaRS）-tRNA 来

Triplet energy transfer catalysis

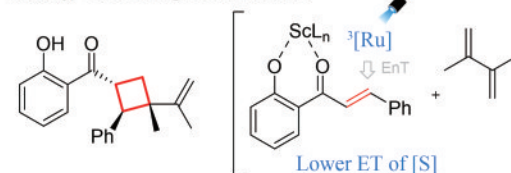


(a) 能量转移催化不对称反应的基本原理
(a) Mechanism of asymmetric reaction driven by energy transfer

Strategy 1: affinitive chiral photosensitizer



Strategy 2: chromophore activation



(b) 能量转移催化手性诱导的两种策略
(b) Two strategies to achieve enantioselectivity for EnT [2+2] cycloaddition

图 19 能量转移驱动的不对称反应

Fig. 19 Asymmetric reaction driven by energy transfer

实现对于琥珀终止密码子UAG向非天然氨基酸的共翻译^[107-108]。首先,非天然氨基酸在正交的氨酰基-tRNA合成酶的作用下得到携带该非天然氨基酸的tRNA,该tRNA可以识别UAG密码子。翻译蛋白过程中,原先的UAG终止密码子不能终止翻译,而是将非天然氨基酸插入多肽链,并被其他的终止密码子所终止,由此得到含定点插入非天然氨基酸的蛋白质。常用非天然氨基酸的侧链基团含酮羰基、叠氮、端炔、四嗪等可进行生物正交反应的官能团,利用该方法可以实现蛋白质表面修饰、抗体偶联药物的定点偶联、蛋白荧光标记等过程^[109-110]。

二苯甲酮是光化学合成中优异经典的能量转移光敏剂,系间窜越的效率接近100%,三重态能量达69.1 kcal/mol^[111],可通过能量转移使底物从基态跃迁至激发态发生光反应。2018年,王江云团队^[112]使用基因密码子扩展技术将二苯甲酮非天然氨基酸(BpA)插入荧光蛋白骨架的发色团位置,构建了一种新型人工光敏蛋白(PSP)。在PSP表面化学修饰引入三联吡啶镍配合物,进一步构建了人工光敏金属酶。通过二苯甲酮基团和镍配合物的协同催化驱动了二氧化碳的还原。在此基础上,2021年,钟芳锐、吴钰周与王江云^[113]的合作研究将该光敏镍酶进一步改造,实现了酶促芳卤与水的交叉偶联反应,并可以拓展至芳卤与

氮亲核试剂的C-N偶联(图20)。瞬态吸收光谱等机理实验表明,该光生物催化偶联反应的关键是PSP的二苯甲酮光敏基团通过能量转移活化促进芳基镍物种的还原消除。值得强调的是,基因编码插入的非天然氨基酸具有位点的精准性,由此可以调控PSP光敏蛋白与Ni^{II}(bpy)辅因子之间的空间距离,提高PSP与Ni^{II}(bpy)辅因子之间能量传递的效率和交叉偶联反应的产率。

由于底物三重态中间体具有活性高、寿命短的特点,能量转移催化的手性具有显著的挑战性,而酶的三维超分子环境则为三重态手性诱导提供了极佳的手段。2022年,吴钰周、钟芳锐与陈希^[114]的合作研究以及Green小组^[115]同时报道了基因编码人工三重态光酶催化的对映选择性[2+2]环加成反应。两项研究工作都是使用基因密码子扩展技术将二苯甲酮非天然氨基酸光敏剂插入合理选定的蛋白骨架中。在吴钰周等的研究中,他们选择文献中已被用于构建人工金属酶的多药耐药性调节剂LmrR^[116-117]作为蛋白骨架。LmrR是一个晶体结构明晰、热稳定性较好的二聚体蛋白,在两个单体界面形成了显著的手性空腔。作者通过基因密码子扩展技术构建了含非天然催化活性中心的人工光酶TPe1.0,随后通过4轮突变迭代优化TPe反应活性空腔的关键残基,由此获得最佳突变体。此外,在二苯甲酮的苯环上3'位置引

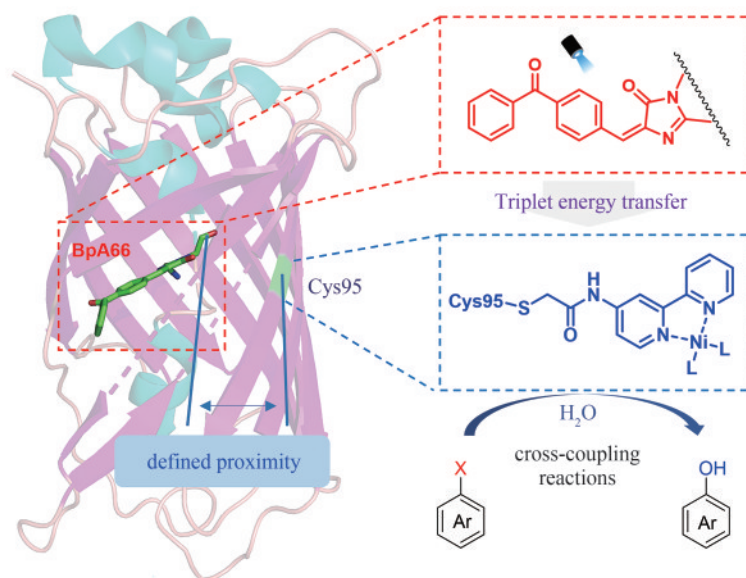


图20 人工光敏脱卤金属酶催化芳卤交叉偶联反应

Fig. 20 Cross-coupling of aryl halides catalyzed by artificial photosensitizer metalloenzyme

入氟原子, 有助于提升光酶的催化活性和对映选择性, 引入所得到的最优突变体 TPe4.0 可高效催化吲哚衍生物的分子内 [2+2] 光环加成反应, 以最高达 97% 的产率及 99% 的 ee 值构建得到一系列手性环丁烷并吲哚类产物 [图 21(a)]。作者解析了 TPe 与底物之间的蛋白晶体结构, 提出反应优异的手性选择性来自光敏剂及空腔内氨基酸残基与底物之间形成的氢键等多重弱键相互作用。

Green 小组的研究将二苯甲酮非天然氨基酸插入之前已经报道的计算机从头设计的蛋白骨架 Diels-Alderase DA_20_00。DA_20_00 的活性位点包括设计的氨基酸残基 (Tyr121 和 Gln195), 其可用于促进 Diels-Alder 反应, 同时也可能用于 [2+2]-环加成的催化。这些残基嵌入一个大的疏水空腔中, 可容纳体积庞大的芳香光敏剂。作者首先通过基因密码子拓展技术构建新型光酶催化剂 (EnT1.0), 使用喹诺酮的分子内 [2+2]-环加成作为模板反应, 通过定向进化后得到一种高对映选择性光酶催化剂 (EnT1.3)。EnT1.3 以最高达 300 的 TON 值及 99% 的 ee 值实现了不对称 [2+2] 光环加成反应 [图 21(b)], 同时还可以拓展用于喹诺酮的分子间对映选择性 [2+2] 环加成。值得强

调的是, 虽然构建 TPe4.0 和 EnT1.3 的蛋白骨架不同, 针对的底物类型也有显著差异, 但两个光酶催化的光环加成反应同时表现出比二苯甲酮化学催化剂显著更高的空气耐受性, 这说明蛋白空腔的微环境有可能起到了隔绝氧气的独特微妙作用。

上述研究基于有机合成、基因工程、酶理论计算和结构生物学等交叉研究背景, 将小分子光敏剂二苯甲酮通过基因密码子拓展技术插入到蛋白的手性空腔中, 构建了含非天然催化活性中心的人工光酶。通过将三重态能量转移的光催化机制与蛋白质的精细超分子腔相结合, 集成了化学光催化剂的高效反应性和生物催化剂的精准选择性两者的优势, 为有机分子激发态反应的手性选择性调控提供了有效的手段, 也从根本上拓展了酶催化的反应性。

由于基因密码子拓展技术依赖于人工进化的正交氨基酰基-tRNA 合成酶 (aaRS)-tRNA 来完成目标非天然氨基酸的定点插入蛋白骨架, 是一个耗时耗力的工作。因此, 该技术适用于构建含某一特定非天然氨基酸的人工光酶分子库, 并结合定向进化技术优化蛋白空腔的微环境, 但难以用于高效筛选大量不同的非天然氨基酸, 对引入过渡金属类光催化剂或者结构复杂的有机光敏基团

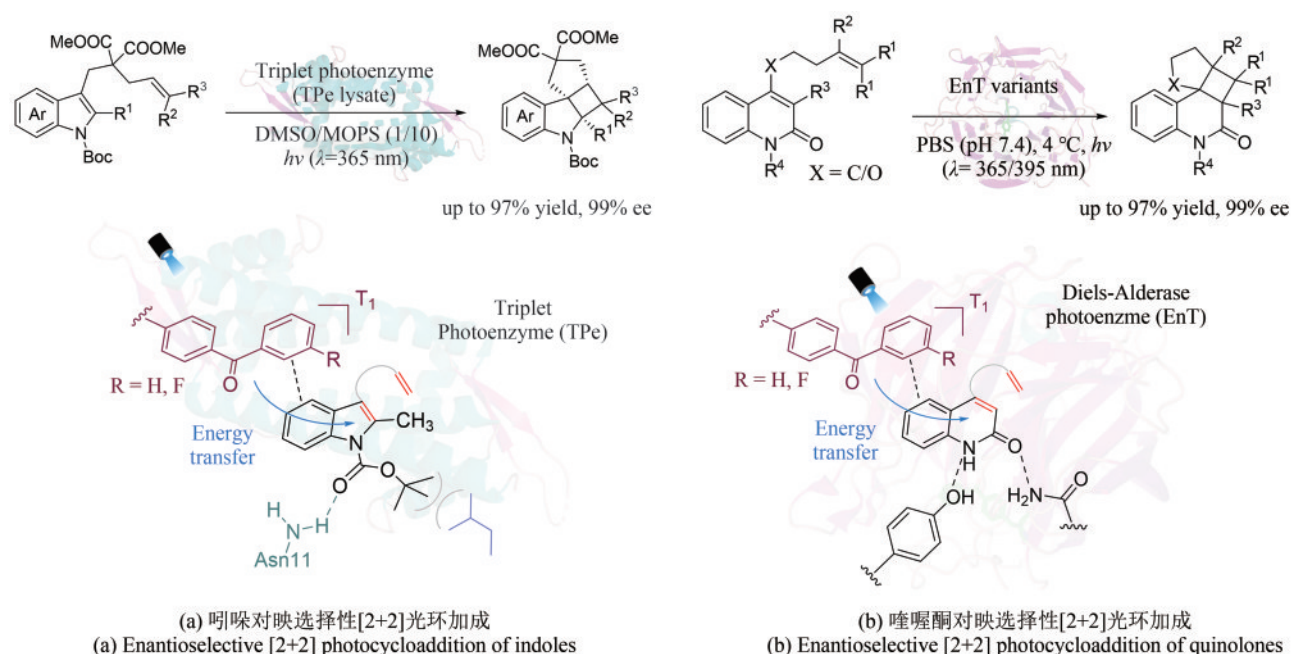


图 21 人工光酶能量转移催化不对称 [2+2] 环加成反应

Fig. 21 Artificial photoenzymes catalyzed asymmetric [2+2] photocycloaddition

也有较大挑战，而这一问题可以通过化学修饰的策略来解决。实际上，通过蛋白化学改造构建人工金属酶已有几十年的研究历史，已经建立比较成熟的理论体系和技术手段，包括蛋白质定点共价偶联技术、超分子导向策略等^[118-119]。这些研究极大拓展了生物酶在有机合成化学中的应用。但是，将化学光催化剂引入蛋白构建非天然光酶的研究仍十分有限。2015年，Lewis教授课题组^[120]结合化学修饰和基因密码子扩展技术将吡啶盐(Acr⁺-Mes)共价连接定点引入到寡肽酶(POP, prolyl oligopeptidase from *Pyrococcus furiosus*)活性空腔内构建出非天然光敏活性中心，该策略以优异的反应性和化学选择性氧化生成亚砷。2023年，该小组^[121]基于相同策略在脯氨酸寡肽酶蛋白骨架结构中共价引入Ir(III)联吡啶复合物非天然金属辅因子构建了一种人工金属酶(ArM)，在可见光照射下通过能量转移催化共轭烯烃和喹诺酮衍生物的不对称[2+2]环加成(图22)。POP活性空腔残基与金属多吡啶配合物之间的疏水、静电相互作用对人工金属酶ArM的光物理化学性质及催化功能有显著影响，不过作者并未深入研究针对此人工金属光酶的高效定向进化策略，反应的立体化学选择性有待提高(9.2:1 dr和14.5% ee)。

5 总结与展望

总体而言，光生物催化集成了光催化丰富反应性和酶催化优异选择性两方面的优势，为高值有机化合物的手性合成提供了新颖的策略。不对称光生物催化在近五年的发展十分迅速，这在很大程度上受到了小分子不对称催化和光催化有机合成等领域的化学原理启发。从上述研究进展可见，不对称光生物催化的策略主要包括化学光催化与天然酶催化耦合、天然辅酶EDA复合物激发催化、辅酶直接光氧化还原和能量转移光酶催化。这些创新性策略基于化学催化与生物酶催化的交叉融合，拓宽了酶催化的底物谱和反应类型，实现了许多单一化学催化剂和生物酶都无法完成的对映选择性反应。近年来，随着基因工程、蛋白质工程等生物学技术的不断发展以及酶突变体的高通量筛选和定向进化技术的广泛应用，人们可以更高效地改造酶催化活性空腔内的关键氨基酸残基，建立并优化蛋白与底物的非共价作用提升酶促生化反应的活性和选择性。

作为一门多学科交叉融合领域，光生物催化仍处于发展初期，存在诸多待解决的挑战。化学光催化与天然酶催化的耦合策略受限于天然辅因子的电子特性及催化中心之间的电子转移效率，

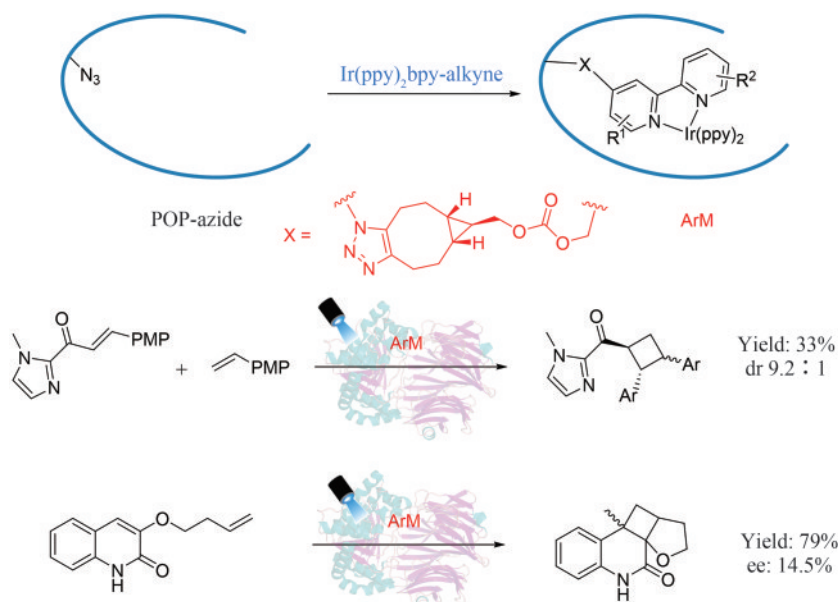


图22 人工光酶催化分子间/分子内不对称[2+2]光环加成(PMP: 对甲氧基苯基)

Fig. 22 Artificial photoenzyme catalyzed asymmetric inter/intra-molecular [2+2] photocycloaddition (PMP: *p*-methoxyphenyl)

EDA 复合物激发及辅酶直接光氧化还原反应驱动的酶促不对称反应策略依赖于天然辅因子与底物分子的电子性质。不过天然酶库是一个巨大宝库, 基于化学原理的指导和合成需求的导向, 化学催化和天然酶耦合的光生物不对称催化体系有广阔的空间等待挖掘。其他天然辅酶或辅酶反应中间体的光催化活性(例如形成EDA复合物的可能性)有待进一步挖掘。另外, 虽然能量转移驱动的人工三重态光酶不依赖自然进化的辅酶结构, 具有更高的设计灵活性, 但目前可引入的人工光敏辅酶及反应类型仍然十分有限。多样性非天然光敏氨基酸的表达具有一定技术难度, 且成本相对较高。如何高效构建多样性非天然光催化活化中心, 低成本快速实现最适突变体的高通量筛选, 并显著提高光酶在非天然反应中的催化效率, 值得深入研究, 而蛋白计算从头设计理论和技术的发展有望为全新人工酶的开发提供革命性的工具。更进一步, 通过探索光酶不对称催化的生物兼容性, 将已报道光酶不对称催化模式拓展至全细胞催化^[122-123], 有望构建光微生物细胞工厂, 实现高价值功能分子的规模化生物制造, 推动合成化学的绿色可持续发展。

参 考 文 献

- [1] NOYORI R. Asymmetric catalysis: science and opportunities (Nobel Lecture)[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(12): 2008-2022.
- [2] YU X H, WANG W. Hydrogen-bond-mediated asymmetric catalysis[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2008, 3(3): 516-532.
- [3] NGUYEN L A, HE H, PHAM-HUY C. Chiral drugs: an overview[J]. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 2006, 2(2): 85-100.
- [4] DE ALBUQUERQUE N C P, CARRAO D B, HABENSCHUS M D, et al. Metabolism studies of chiral pesticides: a critical review[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147: 89-109.
- [5] GONG W, CHEN Z J, DONG J Q, et al. Chiral metal-organic frameworks[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(9): 9078-9144.
- [6] FARINA V, REEVES J T, SENANAYAKE C H, et al. Asymmetric synthesis of active pharmaceutical ingredients[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(7): 2734-2793.
- [7] KATSUKI T, SHARPLESS K B. The first practical method for asymmetric epoxidation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1980, 102(18): 5974-5976.
- [8] ARNOLD F H. Innovation by evolution: bringing new chemistry to life (Nobel Lecture) [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(41): 14420-14426.
- [9] SEAYAD J, LIST B. Asymmetric organocatalysis[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2005, 3(5): 719-724.
- [10] MUKHERJEE S, YANG J W, HOFFMANN S, et al. Asymmetric enamine catalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(12): 5471-5569.
- [11] MACMILLAN D W C. The advent and development of organocatalysis[J]. *Nature*, 2008, 455(7211): 304-308.
- [12] PRIER C K, RANKIC D A, MACMILLAN D W C. Visible light photoredox catalysis with transition metal complexes: applications in organic synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(7): 5322-5363.
- [13] LI C J, TROST B M. Green chemistry for chemical synthesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(36): 13197-13202.
- [14] ROSENTHALER L. Durch enzyme bewirkte asymmetrische synthesen[J]. *Biochem Z*, 1908, 14(1): 238-253.
- [15] ARNOLD F H. Directed evolution: creating biocatalysts for the future[J]. *Chemical Engineering Science*, 1996, 51(23): 5091-5102.
- [16] PACKER M S, LIU D R. Methods for the directed evolution of proteins[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(7): 379-394.
- [17] ZHANG R K, CHEN K, HUANG X Y, et al. Enzymatic assembly of carbon-carbon bonds via iron-catalysed sp³ C-H functionalization[J]. *Nature*, 2019, 565(7737): 67-72.
- [18] PRIER C K, ZHANG R K, BULLER A R, et al. Enantioselective, intermolecular benzylic C-H amination catalysed by an engineered iron-haem enzyme[J]. *Nature Chemistry*, 2017, 9(7): 629-634.
- [19] YI D, BAYER T, BADENHORST C P S, et al. Recent trends in biocatalysis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(14): 8003-8049.
- [20] CIAMICIAN G. The photochemistry of the future[J]. *Science*, 1912, 36(926): 385-394.
- [21] STEPHENSON C R J, YOON T P, MACMILLAN D W C. Visible light photocatalysis in organic chemistry[M]. John Wiley & Sons, 2018.
- [22] UOYAMA H, GOUSHI K, SHIZU K, et al. Highly efficient organic light-emitting diodes from delayed fluorescence[J]. *Nature*, 2012, 492(7428): 234-238.
- [23] LUO J, ZHANG J. Donor-acceptor fluorophores for visible-light-promoted organic synthesis: photoredox/Ni dual catalytic C(sp³)-C(sp²) cross-coupling[J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(2): 873-877.
- [24] YIN Y L, DAI Y T, JIA H S, et al. Conjugate addition-enantioselective protonation of *N*-aryl glycines to α -branched

- 2-vinylazaarenes *via* cooperative photoredox and asymmetric catalysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(19): 6083-6087.
- [25] MACKENZIE I A, WANG L F, ONUSKA N P R, et al. Discovery and characterization of an acridine radical photoreductant[J]. *Nature*, 2020, 580(7801): 76-80.
- [26] NIKIAS N F, GKIZIS P L, KOKOTOS C G. Thioxanthone: a powerful photocatalyst for organic reactions[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2021, 19(24): 5237-5253.
- [27] GROBKOPF J, KRATZ T, RIGOTTI T, et al. Enantioselective photochemical reactions enabled by triplet energy transfer[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 122(2): 1626-1653.
- [28] BRETTEL K, BYRDIN M. Reaction mechanisms of DNA photolyase[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(6): 693-701.
- [29] SANCAR A. Mechanisms of DNA repair by photolyase and excision nuclease (Nobel Lecture) [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(30): 8502-8527.
- [30] GABRUK M, MYSLIWA-KURDZIEL B. Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase: phylogeny, regulation, and catalytic properties[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(34): 5255-5262.
- [31] SORIGUE D, LEGERET B, CUINE S, et al. An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons[J]. *Science*, 2017, 357(6354): 903-907.
- [32] PENG Y Z, CHEN Z C, XU J, et al. Recent advances in photobiocatalysis for selective organic synthesis[J]. *Organic Process Research & Development*, 2022, 26(7): 1900-1913.
- [33] EMMANUEL M A, BENDER S G, BILODEAU C. Photobiocatalytic strategies for organic synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(9), 5459 - 5520.
- [34] 明阳, 陈彬, 黄小强. 光酶催化合成进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(4): 651-675.
- MING Y, CHEN B, HUANG X Q. Recent advances in photoenzymatic synthesis[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(4): 651-675.
- [35] ROMERO N A, NICEWICZ D A. Organic photoredox catalysis[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(17): 10075-10166.
- [36] HUTTON G A M, MARTINDALE B C M, REISNER E. Carbon dots as photosensitisers for solar-driven catalysis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(20): 6111-6123.
- [37] PAL A K, HANAN G S. Design, synthesis and excited-state properties of mononuclear Ru(II) complexes of tridentate heterocyclic ligands[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(17): 6184-6197.
- [38] LI L L, DIAU E W G. Porphyrin-sensitized solar cells[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(1): 291-304.
- [39] ZHANG S H, LIU S S, SUN Y Y, et al. Enzyme-photo-coupled catalytic systems[J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(24): 13449-13466.
- [40] 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.
- [41] KIM J, LEE S H, TIEVES F, et al. Biocatalytic C=C bond reduction through carbon nanodot-sensitized regeneration of NADH analogues[J]. *Angewandte Chemie*, 2018, 130(42): 14021-14024.
- [42] BIEGASIEWICZ K F, COOPER S J, EMMANUEL M A, et al. Catalytic promiscuity enabled by photoredox catalysis in nicotinamide-dependent oxidoreductases[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(7): 770-775.
- [43] NAKANO Y, BLACK M J, MEICHAN A J, et al. Photoenzymatic hydrogenation of heteroaromatic olefins using ene-reductases with photoredox catalysts[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(26): 10484-10488.
- [44] SANDOVAL B A, KURTOIC S I, CHUNG M M, et al. Photoenzymatic catalysis enables radical-mediated ketone reduction in ene-reductases[J]. *Angewandte Chemie*, 2019, 131(26): 8806-8810.
- [45] SUN S Z, NICHOLLS B T, BAIN D, et al. Enantioselective decarboxylative alkylation using synergistic photoenzymatic catalysis[J]. *Nature Catalysis*, 2023: 1-8.
- [46] KWON K, SIMONS R T, NANDAKUMAR M, et al. Strategies to generate nitrogen-centered radicals that may rely on photoredox catalysis: development in reaction methodology and applications in organic synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 122(2): 2353-2428.
- [47] PRATLEY C, FENNER S, MURPHY J A. Nitrogen-centered radicals in functionalization of sp² systems: generation, reactivity, and applications in synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(9): 8181-8260.
- [48] YE Y X, CAO J Z, OBLINSKY D G, et al. Using enzymes to tame nitrogen-centred radicals for enantioselective hydroamination[J]. *Nature Chemistry*, 2023, 15(2): 206-212.
- [49] CHENG L, LI D, MAI B K, et al. Stereoselective amino acid synthesis by synergistic photoredox-pyridoxal radical biocatalysis[J]. *Science*, 2023, 381(6656): 444-451.
- [50] XU Y Y, CHEN H W, YU L, et al. A light-driven enzymatic enantioselective radical acylation[J]. *Nature*, 2024, 625: 74-78.
- [51] KLUGER R, TITTMANN K. Thiamin diphosphate catalysis: enzymic and nonenzymic covalent intermediates[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(6): 1797-1833.
- [52] GIOVANNINI P P, BORTOLINI O, MASSI A. Thiamine-diphosphate-dependent enzymes as catalytic tools for the asymmetric benzoin-type reaction[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016, 2016(26): 4441-4459.
- [53] YANG Q, ZHAO F Q, ZHANG N, et al. Mild dynamic kinetic

- resolution of amines by coupled visible-light photoredox and enzyme catalysis[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(100): 14065-14068.
- [54] LITMAN Z C, WANG Y J, ZHAO H M, et al. Cooperative asymmetric reactions combining photocatalysis and enzymatic catalysis[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 355-359.
- [55] WANG Y J, HUANG X Q, HUI J S, et al. Stereoconvergent reduction of activated alkenes by a nicotinamide free synergistic photobiocatalytic system[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(16): 9431-9437.
- [56] DING X, DONG C L, GUAN Z, et al. Concurrent asymmetric reactions combining photocatalysis and enzyme catalysis: direct enantioselective synthesis of 2,2-disubstituted indol-3-ones from 2-arylidolones[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(1): 118-124.
- [57] DEHOVITZ J S, LOH Y Y, KAUTZKY J A, et al. Static to inducibly dynamic stereocontrol: the convergent use of racemic β -substituted ketones[J]. *Science*, 2020, 369(6507): 1113-1118.
- [58] LIU Y Y, ZHU L Y, LI X M, et al. Photoredox/enzymatic catalysis enabling redox-neutral decarboxylative asymmetric C—C coupling for asymmetric synthesis of chiral 1,2-amino alcohols[J]. *JACS Au*, 2023, 3(11): 3005-3013.
- [59] RUDZKA A, ANTOS N, REITER T, et al. One-pot sequential two-step photo-biocatalytic deracemization of sec-alcohols combining photocatalytic oxidation and bioreduction[J]. *ACS Catalysis*, 2024, 14(3): 1808-1823.
- [60] ZHANG W Y, FERNANDEZ-FUEYO E, NI Y, et al. Selective aerobic oxidation reactions using a combination of photocatalytic water oxidation and enzymatic oxyfunctionalizations[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1(1): 55-62.
- [61] WORTMAN A K, STEPHENSON C R J. EDA photochemistry: mechanistic investigations and future opportunities[J]. *Chem*, 2023, 9(9): 2390-2415.
- [62] ARCEO E, JURBERG I D, ÁLVAREZ-FERNANDEZ A, et al. Photochemical activity of a key donor-acceptor complex can drive stereoselective catalytic α -alkylation of aldehydes[J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(9): 750-756.
- [63] YUAN Y Q, MAJUMDER S, YANG M H, et al. Recent advances in catalyst-free photochemical reactions *via* electron-donor-acceptor (EDA) complex process[J]. *Tetrahedron Letters*, 2020, 61(8): 151506.
- [64] HARRISON W, HUANG X Q, ZHAO H M. Photobiocatalysis for abiological transformations[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2022, 55(8): 1087-1096.
- [65] EMMANUEL M A, GREENBERG N R, OBLINSKY D G, et al. Accessing non-natural reactivity by irradiating nicotinamide-dependent enzymes with light[J]. *Nature*, 2016, 540(7633): 414-417.
- [66] PENG Y Z, WANG Z G, CHEN Y, et al. Photoinduced promiscuity of cyclohexanone monooxygenase for the enantioselective synthesis of α -fluoroketones[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(50): e202211199.
- [67] BIEGASIEWICZ K F, COOPER S J, GAO X, et al. Photoexcitation of flavoenzymes enables a stereoselective radical cyclization[J]. *Science*, 2019, 364(6446): 1166-1169.
- [68] HUANG X Q, WANG B J, WANG Y J, et al. Photoenzymatic enantioselective intermolecular radical hydroalkylation[J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 69-74.
- [69] LI M L, HARRISON W, ZHANG Z Y, et al. Remote stereocontrol with azaarenes *via* enzymatic hydrogen atom transfer[J]. *Nature Chemistry*, 2023: 1-8.
- [70] HUANG X Q, FENG J Q, CUI J W, et al. Photoinduced chemomimetic biocatalysis for enantioselective intermolecular radical conjugate addition[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(7): 586-593.
- [71] ZHU C T, YUAN Z B, DENG Z W, et al. Photoenzymatic enantioselective synthesis of oxygen-containing benzo-fused heterocycles[J]. *Angewandte Chemie*, 2023: e202311762.
- [72] DUAN X Y, CUI D, WANG Z G, et al. A photoenzymatic strategy for radical-mediated stereoselective hydroalkylation with diazo compounds[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(5): e202214135.
- [73] CHEN X Y, ZHENG D N, JIANG L Y, et al. Photoenzymatic hydrosulfonylation for the stereoselective synthesis of chiral sulfones[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023: e202218140.
- [74] OUYANG Y, TUREK-HERMAN J, QIAO T Z, et al. Asymmetric carbohydroxylation of alkenes using photoenzymatic catalysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(31): 17018-17022.
- [75] FU H G, CAO J Z, QIAO T Z, et al. An asymmetric sp^3 - sp^3 cross-electrophile coupling using ene-reductases[J]. *Nature*, 2022, 610(7931): 302-307.
- [76] FU H G, QIAO T Z, CARCELLER J M, et al. Asymmetric C-alkylation of nitroalkanes *via* enzymatic photoredox catalysis [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(2): 787-793.
- [77] SIEGEL L M. Quantitative determination of noncovalently bound flavins: types and methods of analysis[M]. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1978, 53: 419-429.
- [78] GROSHEVA D, HYSTER T K. Light-driven flavin-based biocatalysis[J]. *Flavin-Based Catalysis: Principles and Applications*, 2021: 291-313.
- [79] SANCAR A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors[J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103(6): 2203-2238.
- [80] ZHANG M, WANG L J, ZHONG D P. Photolyase: dynamics

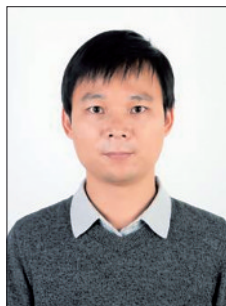
- and electron-transfer mechanisms of DNA repair[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, 632: 158-174.
- [81] CONRAD K S, MANAHAN C C, CRANE B R. Photochemistry of flavoprotein light sensors[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(10): 801-809.
- [82] SORIGUE D, HADJIDEMETRIOU K, BLANGY S, et al. Mechanism and dynamics of fatty acid photodecarboxylase[J]. Science, 2021, 372(6538): eabd5687.
- [83] ZHANG W Y, MA M, HUIJBERS M M E, et al. Hydrocarbon synthesis *via* photoenzymatic decarboxylation of carboxylic acids[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(7): 3116-3120.
- [84] XU J, FAN J J, LOU Y J, et al. Light-driven decarboxylative deuteration enabled by a divergently engineered photodecarboxylase[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 3983.
- [85] LI D Y, HAN T, XUE J D, et al. Engineering fatty acid photodecarboxylase to enable highly selective decarboxylation of trans fatty acids[J]. Angewandte Chemie, 2021, 133(38): 20863-20867.
- [86] AMER M, WOJCIK E Z, SUN C H, et al. Low carbon strategies for sustainable bio-alkane gas production and renewable energy[J]. Energy & Environmental Science, 2020, 13(6): 1818-1831.
- [87] QIN Z Y, ZHOU Y, LI Z, et al. Production of biobased ethylbenzene by cascade biocatalysis with an engineered photodecarboxylase[J]. Angewandte Chemie, e202314566.
- [88] XU J, HU Y J, FAN J J, et al. Light-driven kinetic resolution of α -functionalized carboxylic acids enabled by an engineered fatty acid photodecarboxylase[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58(25): 8474-8478.
- [89] MOU K H, GUO Y, XU W H, et al. Stereodivergent protein engineering of fatty acid photodecarboxylase for light-driven kinetic resolution of Sec - alcohol oxalates[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2024: e202318374.
- [90] ZHENG J, SHEN Z L, GAO J M, et al. Enzymatic photodecarboxylation on secondary and tertiary carboxylic acids[J]. Organic Letters, 2023, 25(48): 8564-8569.
- [91] BLACK M J, BIEGASIEWICZ K F, MEICHAN A J, et al. Asymmetric redox-neutral radical cyclization catalysed by flavin-dependent ene-reductases[J]. Nature Chemistry, 2020, 12(1): 71-75.
- [92] SANDOVAL B A, CLAYMAN P D, OBLINSKY D G, et al. Photoenzymatic reductions enabled by direct excitation of flavin-dependent ene-reductases[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 143(4): 1735-1739.
- [93] ZHANG J W, ZHANG Q Y, CHEN B, et al. Photoenzymatic conversion of enamides to enantioenriched benzylic amines enabled by visible-light-induced single-electron reduction[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(24): 15682-15690.
- [94] ZHAO B B, FENG J Q, YU L, et al. Direct visible-light-excited flavoproteins for redox-neutral asymmetric radical hydroarylation[J]. Nature Catalysis, 2023, 6(11): 996-1004.
- [95] SHI Q L, KANG X W, LIU Z Y, et al. Single-electron oxidation-initiated enantioselective hydrosulfonylation of olefins enabled by photoenzymatic catalysis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2024, 146(4): 2748-2756.
- [96] DUTTA S, ERCHINGER J E, STRIETH-KALTHOFF F, et al. Energy transfer photocatalysis: exciting modes of reactivity[J]. Chemical Society Reviews, 2024, Advance Article.
- [97] POPLATA S, TROSTER A, ZOU Y Q, et al. Recent advances in the synthesis of cyclobutanes by olefin [2+2] photocycloaddition reactions[J]. Chemical Reviews, 2016, 116(17): 9748-9815.
- [98] KLEINMANS R, PINKERT T, DUTTA S, et al. Intermolecular [2 π +2 σ]-photocycloaddition enabled by triplet energy transfer [J]. Nature, 2022, 605(7910): 477-482.
- [99] MUNSTER N, PARKER N A, VAN DIJK L, et al. Visible light photocatalysis of 6 π heterocyclization[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(32): 9468-9472.
- [100] HUANG M X, ZHANG L, PAN T R, et al. Deracemization through photochemical *E/Z* isomerization of enamines[J]. Science, 2022, 375(6583): 869-874.
- [101] BLUM T R, MILLER Z D, BATES D M, et al. Enantioselective photochemistry through lewis acid-catalyzed triplet energy transfer[J]. Science, 2016, 354(6318): 1391-1395.
- [102] ALONSO R, BACH T. A chiral thioxanthone as an organocatalyst for enantioselective [2+2] photocycloaddition reactions induced by visible light[J]. Angewandte Chemie, 2014, 126(17): 4457-4460.
- [103] LI X Y, GROBKOPF J, JANDL C, et al. Enantioselective, visible light mediated aza Paternò -Büchi reactions of quinoxalinones[J]. Angewandte Chemie, 2021, 133(5): 2716-2720.
- [104] HOLZL-HOBMEIER A, BAUER A, SILVA A V, et al. Catalytic deracemization of chiral allenes by sensitized excitation with visible light[J]. Nature, 2018, 564(7735): 240-243.
- [105] NOREN C J, ANTHONY-CAHILL S J, GRIFFITH M C, et al. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins[J]. Science, 1989, 244(4901): 182-188.
- [106] WANG L, SCHULTZ P G. Expanding the genetic code[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44(1): 34-66.
- [107] RYU Y, SCHULTZ P G. Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*[J]. Nature Methods, 2006, 3(4): 263-265.
- [108] DRIENOVSKA I, ROELFES G. Expanding the enzyme

- universe with genetically encoded unnatural amino acids[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 193-202.
- [109] LANG K, CHIN J W. Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(9): 4764-4806.
- [110] YU Y, LIU X H, WANG J Y. Expansion of redox chemistry in designer metalloenzymes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(3): 557-565.
- [111] STRIETH-KALTHOFF F, JAMES M J, TEDERS M, et al. Energy transfer catalysis mediated by visible light: principles, applications, directions[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(19): 7190-7202.
- [112] LIU X H, KANG F Y, HU C, et al. A genetically encoded photosensitizer protein facilitates the rational design of a miniature photocatalytic CO₂-reducing enzyme[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(12): 1201-1206.
- [113] FU Y, HUANG J, WU Y Z, et al. Biocatalytic cross-coupling of aryl halides with a genetically engineered photosensitizer artificial dehalogenase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(2): 617-622.
- [114] SUN N N, HUANG J J, QIAN J Y, et al. Enantioselective [2+2]-cycloadditions with triplet photoenzymes[J]. *Nature*, 2022, 611(7937): 715-720.
- [115] TRIMBLE J S, CRAWSHAW R, HARDY F J, et al. A designed photoenzyme for enantioselective [2+2] cycloadditions[J]. *Nature*, 2022, 611(7937): 709-714.
- [116] ROELFES G. LmrR: a privileged scaffold for artificial metalloenzymes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(3): 545-556.
- [117] DRIENOVSKA I, MAYER C, DULSON C, et al. A designer enzyme for hydrazone and oxime formation featuring an unnatural catalytic aniline residue[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(9): 946-952.
- [118] LEWIS J C. Beyond the second coordination sphere: engineering dirhodium artificial metalloenzymes to enable protein control of transition metal catalysis[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(3): 576-584.
- [119] SANDOVAL B A, HYSTER T K. Emerging strategies for expanding the toolbox of enzymes in biocatalysis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 55: 45-51.
- [120] GU Y F, ELLIS - GUARDIOLA K, SRIVASTAVA P, et al. Preparation, characterization, and oxygenase activity of a photocatalytic artificial enzyme[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(13): 1880-1883.
- [121] LIU B Q, ZUBI Y S, LEWIS J C. Iridium(III) polypyridine artificial metalloenzymes with tunable photophysical properties: a new platform for visible light photocatalysis in aqueous solution[J]. *Dalton Transactions*, 2023, 52(16): 5034-5038.
- [122] FU Y, LIU X H, XIA Y, et al. Whole-cell-catalyzed hydrogenation/deuteration of aryl halides with a genetically repurposed photodehalogenase[J]. *Chem*, 2023, 9(7): 1897-1909.
- [123] 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.



通讯作者: 钟芳锐(1986—),男,教授,博士生导师。研究方向为化学原理驱动的人工酶设计与光生物催化及仿生催化绿色合成。

E-mail: chemzfr@hust.edu.cn



第一作者: 付雨(1992—),男,助理教授。研究方向为化学原理驱动的人工酶设计及其催化应用研究。

E-mail: fuyu@sztu.edu.cn