基于辅因子的光驱动酶催化复合体系

周一诺^{1,2†}, 杨楠^{1,2†}, 田瑶^{1,2}, 宗永超^{1,2}, 李建圣^{1,2}, 张劭^{1,2}, 郭之旗^{1,2}, 宋浩^{1,2*}

1. 天津大学化工学院, 天津 300072;

2. 天津大学合成生物学前沿科学中心, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: hsong@tju.edu.cn

2020-05-20 收稿, 2020-06-25 修回, 2020-07-02 接受, 2020-07-14 网络版发表

国家自然科学基金(21621004)和国家重点基础研究发展计划(2018YFA0901300)资助

摘要 氧化还原酶因其优越的区域、立体和对映体选择性, 并具有反应条件温和、低能耗等优点, 在医药、食品添加剂和燃料等合成中有重大应用. 然而氧化还原酶催化反应需要依赖昂贵的辅因子来提供或接受电子. 最近的研究表明可以利用有机(或无机)光敏剂诱导电子转移实现光驱动下的辅因子再生, 并通过将光催化和生物催化相结合的方法构成一个基于辅因子的光驱动酶催化体系, 实现清洁、高效的化学品合成. 本文综述了近年来基于不同辅因子的光驱动酶催化复合体系的研究进展, 并概述了光直接激发辅因子驱动酶催化的反应体系, 在此基础上对未来的发展进行展望.

关键词 酶催化, 辅因子, 辅因子再生, 光催化, 光驱动酶催化体系

酶催化具有反应条件温和、环境友好、产物特异性高等优点, 是一种公认的绿色、高效的化学品合成方法, 已经广泛用于多种化学品的合成^[1~6]. 氧化还原酶作为一种最大类别的生物酶, 承担着许多重要合成反应, 例如羰基的不对称还原、C-H键的氧化、C=C键的环氧化、Baeyer-Villiger氧化和脱羧等反应, 在化学品合成中有重大应用^[7~10]. 然而氧化还原酶在催化反应时需要相应的辅因子参与, 常用的辅因子包括烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅因子, 即烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)或其磷酸化形式(NADPH), 和黄素辅因子, 即黄素二磷酸腺苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN). 但是这些辅因子的成本较高且稳定性低^[11], 因此如何高效原位再生辅因子, 进而持续驱动酶催化反应, 降低反应成本, 是酶催化反应体系中亟须解决的问题. 针对此问题, 科学家们开发出了多种辅因子再生的方法, 包括酶再生法、化学再生法、电化学再生法和光驱动再生

法^[12,13]. 其中, 光驱动再生辅因子是一种可以利用光敏材料捕获并利用清洁、可持续的太阳能, 实现高效率、快速率驱动辅因子原位再生的方法. 将其与酶催化体系耦合起来, 可实现利用光能持续驱动酶催化反应, 使酶催化更加环境友好、可持续.

上述基于辅酶的光驱动酶催化复合体系, 其机理是模拟自然界中的光合作用, 体系包括电子供体、光敏剂、辅因子、生物催化剂^[13]. 光敏剂在受到光激发后价带上的电子被激发跃迁到导带上产生光生电子, 价带上产生电子空穴, 电子空穴被电子供体淬灭, 光生电子随后直接传递给氧化态辅因子或电子介体, 催化辅因子的还原. 辅因子会参与到酶催化反应中, 驱动反应进行, 同时被氧化成为氧化态. 氧化后的辅因子可再次被光敏材料还原, 进而持续驱动反应的进行. 此外, 辅因子本身也可以作为光敏剂在光和电子供体的驱动下转化为还原态或激发态, 随后驱动酶催化反应.

引用格式: 周一诺, 杨楠, 田瑶, 等. 基于辅因子的光驱动酶催化复合体系. 科学通报, 2020, 65: 4213-4222

Zhou Y N, Yang N, Tian Y, et al. Cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 4213-4222, doi: [10.1360/TB-2020-0610](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0610)

本文根据不同种类的辅因子,分别总结了基于不同辅因子的光驱动酶催化复合体系中的研究进展。同时,辅因子本身作为一种光敏剂,可以直接受到光激发产生电子并驱动酶催化反应。这种新型的光驱动酶催化体系避免了其他光敏剂对酶活性的影响,简化了体系,并且利用光激发辅因子可以改变酶的催化功能,扩大酶的催化范围。最后,介绍了这种光激发辅因子的光-酶体系,并对机理进行了概述与讨论。

1 基于烟酰胺基辅因子再生的光驱动酶催化复合体系

烟酰胺基辅因子(NADH和NADPH)是氧化还原酶最常用的辅因子,大约80%的氧化还原酶需要依赖其催化反应。因此基于烟酰胺基辅因子再生光驱动酶催化复合体系,是研究最广、最为成熟的体系。

1.1 光敏材料研究进展

如何有效捕获太阳光并用于辅因子NAD(P)H的再生是复合体系的重要限制性因素之一。研究者通过制备、优化不同的光敏材料来提高NAD(P)H的光再生效果。截至目前,多种光敏材料已成功用于NAD(P)H的光再生,包括金属氧化物光催化剂^[14]、硫化物光催化剂^[15]、石墨烯基光催化剂^[16]、有机染料^[17]等。其中,石墨相氮化碳(g-C₃N₄)因其独特的化学及带隙结构,优越的热稳定性、化学稳定性,在NAD(P)H的光再生中表现出了优异的性能,催化效率较其他材料是最高的^[12]。

光能吸收效率和电荷分离效率是制约材料光催化效果的两大主要因素。为了增强光吸收能力、提高光能利用率,研究者不断对g-C₃N₄进行形貌改造。Antonietti课题组^[18]受硅藻独特的壳结构及其优异的光合效率启发,以硅藻壳为模板,为g-C₃N₄赋予了独特的硅藻壳结构。该结构可使光子在材料内反复折射,提高光子利用效率,并将这种无金属光敏材料引入基于辅因子的光驱动酶催化复合体系用于NADH再生。另有如多孔球^[19]、纳米棒^[20]、非晶态^[21]等独特的形貌改造,进一步提高了材料的光吸收性能。此外,为了同时提高材料的光吸收效率和电荷分离效率,研究者将其他无机半导体与C₃N₄复合,构建异质结,提高光电性能。Wu等人^[22]报告了一种以核-壳结构为模型的g-C₃N₄@ α -Fe₂O₃/C, α -Fe₂O₃充当额外的光敏剂,碳(C)部分促进电子从 α -Fe₂O₃转移至g-C₃N₄。通过优化纳米壳中 α -Fe₂O₃/C

含量比例,可增强电荷生成和电荷转移两个步骤的匹配和协同作用,大大强化了光催化剂的光响应特性及电荷传输性能,初始反应速率高达7.7 mmol/(L h g)。基于核-壳结构的基础, Yang等人^[23]报告了一种以非晶态二氧化钛(TiO₂)为纳米壳、氮化碳(GCN)为核心的GCN@aTiO₂光催化剂,提升了石墨碳氮化合物的NADH再生效率,发光二极管(LED)光照射10 min可得82.1%的NADH收率,通过优化壳的厚度来协调物质传输,并与甲醇脱氢酶反应相结合,实现稳定可持续的光驱动酶催化反应。

Meng等人^[24]针对协同增强电荷对的激发和分离效率,首次成功地制备了噻吩环修饰的双层空心g-C₃N₄纳米小球(ATCN-DSCN),噻吩环优化了C₃N₄的电子能带结构,极大提高了材料光吸收利用能力、电子-空穴对分离效率、电子转移效率等,展现出了优异的NADH光再生性能。光照15 min再生效率可达74%,为g-C₃N₄再生效率(1.76%)的约40倍,转化频率高达2.95 h⁻¹。将其光催化NADH再生体系与甲酸脱氢酶偶联,构建了光固定二氧化碳持续产生甲酸的人工生物光合成体系,通过9 h光照反应可得甲酸产量290.0 μ mol/L,如图1(a)所示。

1.2 整合体系研究进展

随着研究的不断深入,为了提高光驱动酶催化体系的总体反应效率和稳定性,研究者逐渐着重于对体系进行整合与优化,本部分主要介绍整合体系的研究思路和进展。

缩短光催化剂与电子介体的空间距离是优化体系的思路之一。Ji等人^[25]通过聚乙二醇化方法(pegylation)和石墨烯(graphene)表面组装方法将电子介体结合于光敏剂二维TaS₂纳米片表面构成TaS₂-PEG-GR-M光催化剂(PEG=聚乙二醇, GR=石墨烯; M=[Cp*Rh(phen)Cl]Cl(Cp*=五甲基环戊二烯基, phen=1,10-菲咯啉)),缩短了光生电子向电子介体转移的距离,提高催化效率。NADH再生产率为83.9%,较分离体系(39.7%)提高了2倍。将其与甲酸脱氢酶耦合,可实现CO₂向甲酸的持续转化,光照300 min可生成101.4 mmol/L甲酸,如图1(b)所示。Wu等人^[26]以金属有机框架(metal-organic frameworks, MOF)为基础,将光敏剂NH₂-BDC与电子介体Rh复合物集成在MOF材料中。光激发MOF中的光敏剂产生电子,通过氧化锆团簇转移到壳上Rh复合物反应中心。Rh复合物可作为储存电子介体,协调光生电子生

图 1 (网络版彩色)基于烟酰胺基辅因子再生的光驱动酶催化复合体系图。(a) 噻吩环掺杂的双层空心 $g-C_3N_4$ 小球(ATCN-DSCN)耦合甲酸脱氢酶(FDH)的人工生物光合系统示意图^[24]。(b) TaS_2 -PEG-GR-M作为光催化剂的示意图, 太阳能驱动生物催化人工光合作用系统将二氧化碳转化为甲酸^[25]。(c) 组装了电子介体的光敏铑基金属有机框架(Rh-NU-1006)用于封装甲酸脱氢酶的示意图^[28]。(d) 硫化镉量子点修饰的鱼精蛋白-二氧化钛微胶囊与酶耦合用于光能-化学能转化的示意图^[31]

Figure 1 (Color online) Photo-driven enzymatic catalysis hybrid system diagram based on regeneration of nicotinamide-based cofactor. (a) Schematic illustration of the formate dehydrogenase (FDH)-assisted artificial bio-photosynthesis^[24]. (b) Schematic illustration of TaS_2 -PEG-GR-M as a photocatalyst of the biocatalyzed artificial photosynthesis system for solar-energy driven transformation of CO₂ into formic acid^[25]. (c) Illustration of the primary catalytic cycle, where photochemical NADH regeneration with modified MOF is coupled with enzymatic CO₂ reduction^[28]. (d) Illustration of CdS QDs capsule and enzyme for solar-to-chemical conversion^[31]

成与利用步骤, 提高体系催化效率. 将这一材料运用于NADH再生, 初始反应速率为5.06 mmol/(L h g), 较对照体系2.43 mmol/(L h g)提高了2.08倍. 该体系与氨基酸脱氢酶偶联, 可实现羰基不对称还原为手性胺的催化过程.

除了通过缩短光催化剂与电子介体的空间距离来增强电子传递, 还可以通过将生物酶与NADH再生系统整合为一体, 以提高局域NADH浓度、促进酶催化反应, 这也是优化体系的一大策略. 受叶绿体中的纳米级结构启发, Zhang课题组^[27]将光敏剂TCPP硅前体与电子介体Rh复合物共价结合于硅前体, 通过溶胶-凝胶方法合成了排列精确的TCPP/SiO₂/Rh HNP杂合纳米粒子. 随后利用静电相互作用组装了NADH与NADH依赖型的甲酸脱氢酶, 在杂合纳米粒子表面组装了一个生物催化系统. 该系统缩短了光催化系统与酶催化系统之间的能量传递距离, 提高了微体系中光生电子的转移效率. 与物理混合的游离反应体系相比, 该杂合纳米粒子将NADH再生效率从11%提高至75%(3 h), 甲酸合成产量由15 μ mol/L提升至100 μ mol/L(4 h). Farha

课题组^[28]首次通过溶剂辅助的配体合并方法, 将电子介体Rh复合物整合到铑基的分层多孔MOF: NU-1006中. 整合材料Rh-NU-1006受自然光激发, 在材料内部进行电子传递、实现NADH再生(图1(c)). 与未经整合的Rh复合物、NU-1006的物理混合物相比, 该体系NADH再生效率提升了2倍(28%). 而后使用Rh-NU-1006封装甲酸脱氢酶, 构建了高效的半人工光合体系, 由二氧化碳转化为甲酸, 24 h内甲酸脱氢酶的转化效率为865 h⁻¹.

上述工作从电子传递角度优化了体系的物质扩散及电子传递效率, 然而最近的研究^[29]发现, 光敏材料的光生空穴会将NADH氧化成NAD⁺, 甚至碎片化分解为ADP-核糖, 降低了NADH浓度, 严重制约体系中NADH依赖型酶的催化效率. 同时, 底物间无序、混乱的传递也是限制体系催化效果的重大因素.

Ji等人^[30]利用同轴电纺丝技术将反应体系中的各组分进行精确空间排列及区域划分, 制备了区域化的光驱动酶催化体系. 在该体系内, 光再生NADH体系和酶催化体系精确排列于多层同轴静电纺丝不同层空间

内,既避免了光生空穴对NADH以及酶的伤害,又确保了化学物质间的高效传输.该集成体系有效提高了稳定性与甲醇产量,由溶液游离体系35.6%的甲醇产率提升至90.6%(10 h).受类囊体的结构功能启发,Zhang等人^[31]制备了人工类囊体.该研究将硫化镉量子点修饰鱼精蛋白-二氧化钛微胶囊内壁(CdS/PtTi),将光激发电子生成空穴部分和NADH再生分隔于胶囊内外,避免了空穴对NADH的氧化,NADH光再生效果可达约4226 $\mu\text{mol}/(\text{L g h})$.同时该体系也将光催化与酶催化进行了分隔,通过隔离光生空穴和ROS,避免酶失活.此人工类囊体分别应用于单酶体系(甲酸脱氢酶)和三酶级联体系(甲酸脱氢酶(TsFDH)、甲醛脱氢酶(FalDH)、醇脱氢酶(YADH)),分别实现从二氧化碳到甲酸以及从二氧化碳到甲醇的光催化转化,如图1(d),产率可达1500、99 $\mu\text{mol}/(\text{L h})$.当体系处于明暗循环的仿自然环境中时,其量子产率与天然绿色植物相当.

2 基于黄素辅因子再生的光驱动酶催化复合体系

黄素辅因子也是另一类重要的辅因子,包括黄素单核苷酸辅因子(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸辅因子(FAD).过去的几十年中,人们发现了许多依赖于黄素的单加氧酶,它们可以催化Baeyer-Villiger(BV)反应、芳香羟基化反应、环氧化反应、硫氧化反应,甚至卤化反应.这些反应很难用化学催化剂选择性催化,常用黄素作为辅因子的一类被广泛研究的生物催化剂是老黄酶(OYE)氧化还原酶家族.但由于催化所需的辅因子价格昂贵,科学家寻找能模拟光合作用的光敏剂,利用太阳能催化辅因子再生.

二氧化钛(TiO_2)是应用最广泛的光催化剂.Mifsud等人^[32]使用纳米金修饰的二氧化钛原位还原黄素单核苷酸(FMN),驱动老黄酶催化共轭 $\text{C}=\text{C}$ 双键的不对称还原反应.首次证明了由 TiO_2 半导体介导的水氧化可以有效地与氧化还原酶偶联,从而实现光生物催化氧化还原反应,对氧化还原生物催化产生重大影响.在紫外光照射下 TiO_2 催化水分解获得电子并同时催化FMN还原,通过黄素介导将转移电子至氧化还原酶老黄酶的活性位点,催化异佛尔酮立体选择性转化为(R)-左旋二酮.最终,反应6 h产物转化率为66%,对应体过量百分数为86%.钌(III)的化合物($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, $\text{bpy}=2,2'$ -联吡啶)也是研究最广泛的光敏剂,具有化学稳定性高、氧化还原活性高和寿命激发态长的优点,是理想的光敏

剂^[33].Peers等人^[34]利用钌(III)化合物($[\text{Ru}(\text{bpz})^2(\text{Me}_2\text{ppy}^{2+})]^{4+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{Me}_2\text{ppy}^{2+})_2]^{6+}$, $\text{bpz}=2,2'$ -联吡啶, $\text{ppy}=\text{四吡}$)和铱(III)化合物($[\text{Ir}(\text{Me}-2,2'\text{-bpy})^2(\text{bpy})]^{3+}$ 、 $[\text{Ir}(\text{Me}-3,2'\text{-bpy})^2(\text{dCF}_3\text{bpy})]^{3+}$)作为光敏剂,三乙醇胺(TEOA)作为电子供体.光敏剂产生的电子通过电子介体甲基紫精(MV^+)传递给老黄酶驱动黄素直接再生进而催化 α,β -不饱和烯烃还原.利用过渡金属络合物开发实用的光驱动生物催化系统具有很大的潜力,为昂贵的氧化还原辅酶再生系统提供了一种替代方法.

除了金属材料,染料也可以作为光敏剂受到光激发产生电子.蒽染料是一种低成本的光敏剂,能够以高量子效率捕获光能,被应用于化学还原反应.Park课题组^[35]利用蒽醌类染料孟加拉玫瑰红(RB)为光敏剂、老黄酶家族的烯酸还原酶(OYEs)为生物催化剂、TEOA为电子供体,在可见光照射下,光激发电子从RB直接转移到含有黄素的同系物(*Thermus scotoductus*, $Ts\text{OYE}$),通过2个电子和2个质子的转移实现还原黄素的再生并驱动2-甲基环己酮向(R)-2-甲基环己酮的对映选择性转化,实现了低消耗的黄素再生.最终,2-甲基环己酮的转化率为80%~90%,对映体纯度 $ee>99\%$.Park课题组^[36]在此研究基础上,将RB和 $Ts\text{OYE}$ 包埋于海藻酸钠小球里催化 $\text{C}=\text{C}$ 双键的不对称氢化反应,增强了 $Ts\text{OYE}$ 的热稳定性和化学变性.在白色LED的照射下,光诱导电子从RB直接转移到结合在酶上的黄素辅因子基团,在海藻酸钠珠内催化2-甲基环己酮不对称还原为对映体纯(R)-2-甲基环己酮,最大转化率为70.4%, $ee>99\%$,转化频率为 1.54 min^{-1} .固定化后的RB和 $Ts\text{OYE}$ 的稳定性(如热稳定性、化学稳定性)和重复使用性显著增强.这项研究为利用光能生产高附加值化学品提供了一种更绿色、可持续的无辅因子OYE催化方法.

3 基于光激发辅因子的光驱动酶催化复合体系

黄素或烟酰胺一方面是酶的辅因子,另一方面,它本身也是一种特性良好的光催化剂.因此本节综述了辅因子本身作为光敏剂驱动酶催化反应的体系,这种体系降低了整体复杂度.

3.1 利用光激发辅因子催化天然反应

Hollmann等人^[37]证明了光可以驱动还原型黄素酶再生,并设计了光驱动黄素依赖型酶促反应体系,其中光作为能量来源,乙二胺四乙酸(EDTA)为电子供体,以

廉价的成本实现了连续的酶催化反应。光激发下, FAD由氧化态成为还原态, 驱动苯丙酮单加氧酶突变体(PAMO-P3)催化酮类BV反应。这项工作为其他黄素依赖型酶利用光驱动催化BV反应提供了基础。Le等人^[38]利用天然黄素分子, 特别是黄素单核苷酸作为光敏剂, 并与P450酶耦合, 开发出一种基于光激发辅因子酶催化体系, 催化C-羟基化反应。在该体系中, 光活化后的黄素将电子直接转移给P450酶血红素中心, 实现了4-硝基苯酚和月桂酸的光生物催化C-羟基化反应(图2(a))。

Kottke课题组^[39]将依赖于黄素的卤代酶与光激发黄素辅因子结合, 可选择性地生成氯代和溴代吡啶衍生物。他们以皱纹链霉菌的卤代酶(PyrH)为模型系统, 同蓝光和还原剂建立一种高效的FADH₂与PyrH偶联的再生体系。FAD在蓝光照射下被还原为FADH₂并被卤代酶利用催化氯化物的生成。循环25 h后, 70%的0.5 mmol/L色氨酸被区域选择性地转化为5-氯色氨酸。这种再生系统只需使用光、卤化物盐、空气和廉价的电子供体, 为卤代化合物的生产提供了方案。Hollmann课题组^[40]又将光激发的FADH₂与假单胞菌VLB120的苯乙烯单加氧酶偶联, 证明了苯乙烯单加氧酶可以直接通过光化学再生并催化产生高对映体选择性的环氧化合物。该研究发现, FAD具有光不稳定性, FADH₂在光照下可能发生向FAD和过氧化氢的无效氧化, 降低生物催化剂的活性, 影响生物催化效率。

Gonçalves等人^[41]在光激发辅因子的光-酶体系中使用吗啉溶液: 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)作为电子供

体提高黄素辅因子的稳定性, 避免过氧化物的生成、稳定酶的催化活性。在氧气存在下, 光激发黄素后产生有害的活性氧物质, 如过氧化氢和超氧阴离子, 损害酶的活性。因此他们用MOPS作为电子供体, 在光激发下, MOPS可以与FAD形成一种寿命长且稳定的FAD激发系统。这限制了在氧气存在下过氧化氢和其他活性氧的形成, 进而提高辅因子和酶的稳定性。激发后的FAD驱动环己酮单加氧酶催化BV反应, 辐照6 h后可获得90%的产率(完全转化率), TOF为32 h⁻¹。环己酮单加氧酶在MOPS缓冲液中的半衰期是在Tris-HCl缓冲液中的2倍, 并且孵育50 h后, MOPS中的酶活性仍保持在其初始值的60%, 表明了MOPS可保护酶免于失活。此外, 他们又表明在有氧条件下, 包括MOPS在内的吗啉溶液对FMN的光还原作用, 并可以防止假单胞菌烯酸还原酶XenB的失活, 催化异佛尔酮为左旋二酮, 得到91%的产率和大于94%的立体选择性^[42]。与Tris-HCl缓冲液相比, 在MOPS缓冲液中热不稳定XenB的动力学稳定性提高了20倍以上。

Beisson课题组^[43]发现了一种可以被光催化的可变小球藻NC64A光酶, 可以催化游离脂肪酸脱羧生成正构烷烃或烯烃。NC64A蛋白质的晶体结构表明在疏水通道中有一个脂肪酸结合位点, 该疏水通道通向捕获光能的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅因子。因此, NC64A受蓝光激发后, FAD变成激发态FAD*后通过疏水通道从脂肪酸中提取电子, 生成烷基自由基的脂肪酸自由基脱羧基和FAD[•], FAD[•]将电子转移至生成的

图2 (网络版彩色)利用光激发辅因子催化天然反应体系图。(a) P450与黄素(核黄素、FMN和FAD)作为光敏剂的光驱动光生物催化反应的示意图^[38]。(b) 用NAD⁺直接光驱动TsOYE活化C=C键的加氢反应。光激活的NAD⁺将其光激发电子转移到人工FMN^[45]。EWG, 吸电子基

Figure 2 (Color online) Diagram of natural reaction system catalyzed by light-excited cofactors. (a) A schematic illustration of the light-driven photobiocatalytic reaction by P450 with flavins (riboflavin, FMN, and FAD) as photosensitizers^[38]. (b) Hydrogenation of activated C=C bonds via direct, light-driven activation of TsOYE using NAD⁺. Photoactivated NAD⁺ transfers its photoexcited electrons to the prosthetic FMN^[45]. EWG, electron-withdrawing group

烷基自由基. 由于烷基阴离子极强的质子亲和力, 质子供体XH将氢原子转移至初级烷基自由基, 随后从FAD[•]转移至X[•], X[•]重新调节, 释放烷烃结合新基质. 最终通过光激发FAD从脂肪酸中提取电子引发脱羧反应, 实现NC64A在蓝光驱动下的催化游离脂肪酸脱羧为正构烷烃或烯烃, 量子产率>80%. 该研究将可变小球藻NC64A光酶称之为脂肪酸光脱羧酶, 在光驱动的生物基碳氢化合物生产中有一定作用. Hollmann课题组^[44]利用可变小球藻NC64A(CvFAP)合成新型光脱羧酶CvFAPC, 将脂肪酸和甘油三酯不可逆的转化为对应的烷烃. 接下来, 他们将脂肪酶催化三油酸甘油酯为油酸和甘油的水解反应和CvFAPC催化的光脱羧反应偶联, 构成双酶级联反应, 成功地将三聚烯转化为(Z)-庚烷-8-烯. 可以在此研究的基础上进一步优化反应装置和生物催化剂, 开发一种实用的方法, 将非食用甘油三酯和酸转化为高价值的生物燃料.

Park课题组^[45]报道了利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸作为光催化剂, 并将光激发电子直接传递给辅因子的方法. 这种方法将氧化还原生物催化与光催化结合起来, 使非光催化酶能够进行光催化氧化还原反应. 该研究揭示了NAD⁺的两个 π -共轭体系(即烟酰胺和腺嘌呤)的光吸收和电子性质. 此外, NAD⁺在UV-Vis-NIR辐射下表现出较强的光稳定性. 在 π 共轭体系中, 电子从杂化的原子p_z轨道的重叠处以圆形 π 键离域. 当NAD⁺光敏化时, 这些电子可以被激发到能量更高的水平, 获得足够的还原能力来还原相邻的分子或离子. 最后, 光激活的NAD⁺将电子转移到黄素部分, 直接激活老黄酶家

族的烯还原酶(TsOYE, *Thermus scotoductus* SA-01)催化活性C=C键的立体选择性氢化, 生成3-甲基环己酮, 如图2(b). 用NAD⁺直接光活化OYE, 获得了由OYE驱动的光生物催化转化中最高太阳能-化学能转化率, 为1263.4 h⁻¹.

3.2 利用光激发辅因子催化非天然反应

Hyster课题组^[46]发现光激发黄素依赖的烯类酶(EREDs)可以改变催化功能, 促进不对称自由基环化. 他们以EREDs为基础, 研究出了活性较高的突变体GluER-T36A, 可用于 α -氯酰胺的环化反应并生成 β -立体异构的内酰胺. 在酶活性位点内, 底物与FMN_{sq}之间形成电子供体-受体配合物. 光照后, 底物最初被一个电子还原, α -酰基与烯炔反应以提供环外自由基, 该环外自由基通过从中性黄素半醌(FMN_{sq})获得氢原子而淬灭, 从而生成了 β -立体异构的内酰胺和氧化的黄素. 黄素氢醌的光激发态(FMN_{sq}^{*})应该能够完成使电子转移到 α -氯酰胺的初始电子转移. 接着他们又利用EREDs的突变体实现催化不对称氧化还原中性自由基环化反应^[47], 催化 α -卤代酰胺生成高对映体羟吲哚. 其中三-(羟甲基)甲基甘氨酸缓冲液负责将FMN还原为FMN_{sq}⁻, FMN_{sq}⁻还原底物生成 α -酰基和FMN. 自由基的环化产生还原的乙烯基酰胺基, 该自由基可被FMN氧化形成产物并再生FMN_{sq}⁻. 机制研究表明反应通过黄素半醌/醌类氧化还原偶联进行, 其中基态黄素半醌为底物还原提供电子, 且黄素醌类氧化了环化后形成的插烯 α -氨基自由基, 如图3(a)所示. 对该酶家族来说, 突出了

图3 (网络版彩色)利用光激发辅因子催化非天然反应体系图. (a) 羟吲哚形成的机理^[47]. (b) 对映选择性自由基脱卤机理^[48]
Figure 3 (Color online) Diagram of non-natural reaction system catalyzed by light-excited cofactor. (a) Mechanism of oxindole formation^[47]. (b) Mechanism for enantioselective radical dehalogenation^[48]

EREDs在不对称合成中的多功能性,为立体选择性地生成Csp²-Csp³键提供一种新的生物催化策略。

Hyster课题组^[48]利用光照射烟酰胺依赖型酶(KREDs),赋予了该酶催化非天然底物的反应性能。在可见光照射下,烟酰胺依赖酶酮还原酶可以从羰基还原酶转化为自由基引发剂和手性氢原子源,实现内酯的高对映选择性自由基脱卤化。在KRED的活性位点内,由卤代内酯和NAD(P)H组成的电荷转移络合物的辐照影响电子转移,形成 $I^{\cdot-}\cdot NADPH^{++}cKRED(II)$,其中 c 表示包含在活性位点中)。II在C-Br键的介孔裂解时形成 $I^{\cdot} \cdot NADPH^{++}cKRED(III)$ 。起始物质的两个对映体在活性位点内结合,并且在脱卤化和前手性自由基 $I^{\cdot}$ 形成时,在活性位点内发生构象变化以完成氢原子转移,形成 $2 \cdot NADP^{+}cKRED(IV)$ 。最后,NADP⁺可以被异丙醇或葡萄糖脱氢酶还原以完成催化循环,如图3(b)。一种自由基物种在这种反应中充当中间产物,NADH和NADPH同时充当光敏剂和氢原子的来源。该方法强调了利用常见生物共因子的激发态使酶具有新反应性的潜力。这一策略将使许多自由基介导的反应具有高度选择性。

4 基于辅因子的光驱动酶催化体系电子供体研究

电子供体是光驱动酶催化体系中重要的环节,因为体系中生成产物所需电子来源于电子供体。同时电子供体也是影响体系催化效率的重要因素,光敏剂在受到光激发后价带上的电子被激发跃迁到导带上产生光生电子,价带产生电子空穴,电子空穴需要电子供体淬灭空穴,淬灭效率将影响电子传递效率,进而影响体系催化效率^[24]。最终,在基于辅酶的光驱动酶催化复合体系中,电子供体通过光敏剂在光诱导下提供电子,电子最终被传递给酶进而催化氧化还原反应。

电子供体是一种具有还原性的物质,能及时消除反应体系中的光生空穴并形成氧化化合物,提高电子传递效率^[49]。电子供体的选取要求自身被氧化后形成的氧化化合物不能干扰光化学循环的正常运行,电子供体的 Pk_a 值接近体系的pH以最有效地提供电子,并且需要较低的氧化电势。一些常见的电子供体包括抗坏血酸、三乙醇胺(TEOA)、乙二胺四乙酸(EDTA)和2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)^[13]。其中,最优的电子供体为TEOA和EDTA。这种电子供体可以实现单电子氧化,提高体系催化效率,生成的氧化中间体对体系无影响并

且稳定性高。除此之外,它们的 pK_a 值在5~8之间,符合大多数酶反应的催化pH范围^[49]。而抗坏血酸的氧化产物是脱氢抗坏血酸,它能够氧化系统中的底物或者产物。基于辅因子的光驱动酶催化体系是模拟自然界中的光合作用,自然光合作用的电子供体为水,因此体系的理想电子供体为水,是一种廉价、清洁的电子供体,能满足低成本的光催化需求。但是以水作为电子供体并实现高效率的电子传递是一个挑战,电子的氧化水需要很高的过电势^[50],光敏剂价带的位置应比O₂/H₂O的氧化电势高,生成氧气困难。未来需开发高效氧化水的光敏剂,达到以水为电子供体利用太阳能催化氧化还原反应的理想状态。

5 总结与展望

基于辅因子的光驱动酶催化体系有望满足日益增长的可持续化学的需求,通过模拟自然光合作用,实现了将太阳能转化为高价值的化学品的目标。按照辅因子受激发的方式可以将光驱动酶催化体系分为光驱动的辅因子再生体系和光激发辅因子光-酶复合体系。光驱动的辅因子再生体系需要光敏剂作为光催化剂来吸收太阳能产生电子进而催化辅酶再生。直接光激发辅因子不仅可以使氧化还原酶催化天然反应,而且可以通过调整反应体系拓宽酶的催化应用,使酶催化非天然底物的转化,为高价值的化学品合成提供策略。尽管光-酶复合体系的研究取得了上述成就,但是仍存在许多问题和缺陷,以下是光驱动酶催化体系中必须解决的主要问题和挑战:(1)光驱动氧化还原酶反应研究较少,利用光敏剂进行的人工光合作用研究大多局限于二氧化碳还原或者老黄酶天然反应,产物具有局限性。因此需要研究探索新的适合光驱动的氧化还原酶,扩展新的催化反应。(2)体系中太阳能转化为化学品的效率较低,大多数反应的转换数和转化效率较低。光敏剂的不稳定性和物质间较低的碰撞效率都会导致电子传递效率较低。为了提高光驱动酶催化的效率,需要提高光敏剂的电子分离效率和稳定性,此外,还需要考虑光敏剂和氧化还原酶之间的特定相互作用,例如静电相互作用或特定的共价键与氧化还原酶相互作用,促进光诱导电子的有效转移。(3)光照下产生强氧化剂和活性自由基,可能会导致酶活性的损伤,需要在系统中进行对酶的保护工作,例如隔室分离或者载体保护。还可以通过合成生物学方法从头设计,开发稳定性强、耐受性高的酶。进一步研究克服这些挑战,为可持续的光

驱动酶催化体系开辟一条新途径。总体而言, 基于辅酶的光驱动酶催化体系已得到广泛的研究与发展, 崭新的概念与前沿的反应策略有望出现, 为光酶催化体系研究提供新的思路。

参考文献

- 1 Rudroff F, Mihovilovic M D, Gröger H, et al. Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis. *Nat Catal*, 2018, 1: 12–22
- 2 de Souza R O M A, Miranda L S M, Bornscheuer U T. A retrosynthesis approach for biocatalysis in organic synthesis. *Chem Eur J*, 2017, 23: 12040–12063
- 3 Schwizer F, Okamoto Y, Heinisch T, et al. Artificial metalloenzymes: Reaction scope and optimization strategies. *Chem Rev*, 2018, 118: 142–231
- 4 Sheldon R A, Woodley J M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chem Rev*, 2018, 118: 801–838
- 5 Bornscheuer U T, Huisman G W, Kazlauskas R J, et al. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 2012, 485: 185–194
- 6 Clouthier C M, Pelletier J N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 1585–1605
- 7 Kroutil W, Mang H, Edegger K, et al. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8: 120–126
- 8 Wu H, Tian C, Song X, et al. Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chem*, 2013, 15: 1773–1789
- 9 Monti D, Ottolina G, Carrea G, et al. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chem Rev*, 2011, 111: 4111–4140
- 10 Xu F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind Biotechnol*, 2005, 1: 38–50
- 11 Faber K, Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, 1992
- 12 Wang X, Saba T, Yiu H H P, et al. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterogeneous pathways. *Chem*, 2017, 2: 621–654
- 13 Lee S H, Choi D S, Kuk S K, et al. Photobiocatalysis: Activating redox enzymes by direct or indirect transfer of photoinduced electrons. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 7958–7985
- 14 Lee S H, Ryu J, Nam D H, et al. Photoenzymatic synthesis through sustainable NADH regeneration by SiO₂-supported quantum dots. *Chem Commun*, 2011, 47: 4643–4645
- 15 Nam D H, Lee S H, Park C B. CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals for highly efficient regeneration of nicotinamide cofactor under visible light. *Small*, 2010, 6: 922–926
- 16 Choudhury S, Baeg J O, Park N J, et al. A solar light-driven, eco-friendly protocol for highly enantioselective synthesis of chiral alcohols via photocatalytic/biocatalytic cascades. *Green Chem*, 2014, 16: 4389
- 17 Lee S H, Kwon Y C, Kim D M, et al. Cytochrome P450-catalyzed *O*-dealkylation coupled with photochemical NADPH regeneration. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 383–390
- 18 Liu J, Antonietti M. Bio-inspired NADH regeneration by carbon nitride photocatalysis using diatom templates. *Energy Environ Sci*, 2013, 6: 1486–1493
- 19 Pao H T, Chen C C. Decoupling strategies: CO₂ emissions, energy resources, and economic growth in the group of twenty. *J Clean Prod*, 2019, 206: 907–919
- 20 Liu J, Cazelles R, Chen Z P, et al. The bioinspired construction of an ordered carbon nitride array for photocatalytic mediated enzymatic reduction. *Phys Chem Chem Phys*, 2014, 16: 14699–14705
- 21 Son E J, Lee Y W, Ko J W, et al. Amorphous carbon nitride as a robust photocatalyst for biocatalytic solar-to-chemical conversion. *ACS Sustain Chem Eng*, 2018, 7: 2545–2552
- 22 Wu Y, Ward-Bond J, Li D, et al. g-C₃N₄@ α -Fe₂O₃/C photocatalysts: Synergistically intensified charge generation and charge transfer for NADH regeneration. *ACS Catal*, 2018, 8: 5664–5674
- 23 Yang D, Zhang Y, Zhang S, et al. Coordination between electron transfer and molecule diffusion through a bioinspired amorphous titania nanoshell for photocatalytic nicotinamide cofactor regeneration. *ACS Catal*, 2019, 9: 11492–11501
- 24 Meng J, Tian Y, Li C, et al. A thiophene-modified double-shell hollow g-C₃N₄ nanosphere boosts NADH regeneration via synergistic enhancement of charge excitation and separation. *Catal Sci Technol*, 2019, 9: 1911–1921
- 25 Ji X, Liu C, Wang J, et al. Integration of functionalized two-dimensional TaS₂ nanosheets and an electron mediator for more efficient biocatalyzed artificial photosynthesis. *J Mater Chem A*, 2017, 5: 5511–5522
- 26 Wu Y, Shi J, Li D, et al. Synergy of electron transfer and electron utilization via metal-organic frameworks as an electron buffer tank for nicotinamide regeneration. *ACS Catal*, 2020, 10: 2894–2905
- 27 Ji X, Wang J, Mei L, et al. Porphyrin/SiO₂/Cp*Rh(bpy)Cl hybrid nanoparticles mimicking chloroplast with enhanced electronic energy transfer for biocatalyzed artificial photosynthesis. *Adv Funct Mater*, 2018, 28: 1705083
- 28 Chen Y, Li P, Zhou J, et al. Integration of enzymes and photosensitizers in a hierarchical mesoporous metal-organic framework for light-driven CO₂ reduction. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 1768–1773

- 29 Zhang S, Shi J, Chen Y, et al. Unraveling and manipulating of NADH oxidation by photogenerated holes. *ACS Catal*, 2020, 10: 4967–4972
- 30 Ji X, Su Z, Wang P, et al. Integration of artificial photosynthesis system for enhanced electronic energy-transfer efficacy: A case study for solar-energy driven bioconversion of carbon dioxide to methanol. *Small*, 2016, 12: 4753–4762
- 31 Zhang S, Shi J, Sun Y, et al. Artificial thylakoid for the coordinated photoenzymatic reduction of carbon dioxide. *ACS Catal*, 2019, 9: 3913–3925
- 32 Mifsud M, Gargiulo S, Iborra S, et al. Photobiocatalytic chemistry of oxidoreductases using water as the electron donor. *Nat Commun*, 2014, 5: 3145
- 33 Juris A, Balzani V, Barigelli F, et al. Ru(II) polypyridine complexes: Photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence. *Coord Chem Rev*, 1988, 84: 85–277
- 34 Peers M K, Toogood H S, Heyes D J, et al. Light-driven biocatalytic reduction of α,β -unsaturated compounds by ene reductases employing transition metal complexes as photosensitizers. *Catal Sci Technol*, 2016, 6: 169–177
- 35 Lee S H, Choi D S, Pesic M, et al. Cofactor-free, direct photoactivation of enoate reductases for the asymmetric reduction of C=C bonds. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 8681–8685
- 36 Yoon J, Lee S H, Tieves F, et al. Light-harvesting dye-alginate hydrogel for solar-driven, sustainable biocatalysis of asymmetric hydrogenation. *ACS Sustain Chem Eng*, 2019, 7: 5632–5637
- 37 Hollmann F, Taglieber A, Schulz F, et al. A light-driven stereoselective biocatalytic oxidation. *Angew Chem*, 2007, 119: 2961–2964
- 38 Le T K, Park J H, Choi D S, et al. Solar-driven biocatalytic C-hydroxylation through direct transfer of photoinduced electrons. *Green Chem*, 2019, 21: 515–525
- 39 Schroeder L, Frese M, Müller C, et al. Photochemically driven biocatalysis of halogenases for the green production of chlorinated compounds. *ChemCatChem*, 2018, 10: 3336–3341
- 40 van Schie M M C H, Paul C E, Arends I W C E, et al. Photoenzymatic epoxidation of styrenes. *Chem Commun*, 2019, 55: 1790–1792
- 41 Gonçalves L C P, Mansouri H R, Bastos E L, et al. Morpholine-based buffers activate aerobic photobiocatalysis via spin correlated ion pair formation. *Catal Sci Technol*, 2019, 9: 1365–1371
- 42 Gonçalves L C P, Mansouri H R, PourMehdi S, et al. Boosting photobioredox catalysis by morpholine electron donors under aerobic conditions. *Catal Sci Technol*, 2019, 9: 2682–2688
- 43 Sorigué D, Legeret B, Cuiné S, et al. An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons. *Science*, 2017, 357: 903–907
- 44 Huijbers M M E, Zhang W, Tonin F, et al. Light-driven enzymatic decarboxylation of fatty acids. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 13648–13651
- 45 Kim J, Lee S H, Tieves F, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide as a photocatalyst. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax0501
- 46 Biegasiewicz K F, Cooper S J, Gao X, et al. Photoexcitation of flavoenzymes enables a stereoselective radical cyclization. *Science*, 2019, 364: 1166–1169
- 47 Black M J, Biegasiewicz K F, Meichan A J, et al. Asymmetric redox-neutral radical cyclization catalysed by flavin-dependent “ene”-reductases. *Nat Chem*, 2019, 12: 71–75
- 48 Emmanuel M A, Greenberg N R, Oblinsky D G, et al. Accessing non-natural reactivity by irradiating nicotinamide-dependent enzymes with light. *Nature*, 2016, 540: 414–417
- 49 Pellegrin Y, Odobel F. Sacrificial electron donor reagents for solar fuel production. *C R Chim*, 2017, 20: 283–295
- 50 Kalyanasundaram K, Graetzel M. Artificial photosynthesis: Biomimetic approaches to solar energy conversion and storage. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21: 298–310

Summary for “基于辅因子的光驱动酶催化复合体系”

Cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems

Yinuo Zhou^{1,2†}, Nan Yang^{1,2†}, Yao Tian^{1,2}, Yongchao Zong^{1,2}, Jiansheng Li^{1,2}, Mai Zhang^{1,2}, Zhiqi Guo^{1,2} & Hao Song^{1,2*}¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;² Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Frontier Science Center for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding author, E-mail: hsong@tju.edu.cn

Enzymatic catalysis has received tremendous attention owing to its mild reaction conditions, remarkable stereoselectivity and specificity that chemical synthesis methods are technically challenging. Oxidoreductases as the largest group of enzymes in the Enzyme Commission nomenclature play a vital role in a myriad of chemical transformations (e.g., asymmetric reduction, oxygenation, hydroxylation, epoxidation, Baeyer-Villiger oxidation) with wide applications in food additives, medicine and energy industries. However, these enzymes require costly cofactors, including nicotinamide adenine dinucleotide cofactor (NADH) or its phosphorylated form (NADPH), and the flavin cofactor (FAD) or flavin mononucleotide (FMN), to supply or accept electrons for fulfilling catalytic function. Therefore, how to efficiently regenerate cofactors in situ for sustainably driving enzymatic catalysis reactions is an urgent problem to be solved. To address this issue, scientists have developed a variety of cofactor regeneration methods, including enzymatic regeneration, chemical regeneration, electrochemical regeneration, and solar-driven regeneration. Among them, solar-driven cofactor regeneration is a high-efficient method by which photosensitive materials can capture the clean and sustainable solar energy for in situ regenerating cofactor with a fast rate. Moreover, coupling it with the enzymatic catalysis system to construct solar-driven enzymatic catalysis hybrid system can realize a continuously enzymatic catalysis reaction driven by light energy, making the enzyme catalysis more environmentally friendly and sustainable. The mechanism of the cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis hybrid system is to simulate the natural photosynthesis. In natural photosynthesis, photosystems (photosystems II and photosystems I) capture sunlight and generate the photo-excited electrons. Simultaneously, H₂O is oxidized to O₂ to quench the holes generated in photosystems. The high-energy photo-excited electrons are subsequently transferred to the ferredoxin-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reductase (FNR) via a transport chain. FNR then utilize the electrons to reduce NADP⁺ into NADPH. NADPH, as reducing equivalents, subsequently are used for enzymatic CO₂ reduction in the Calvin cycle. In the cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis system, similar with natural photosynthetic process, photosensitizer could absorb light, and the electrons in the valence band transfer to the conduction band, generating photo-excited electrons, while the holes generated in the valence band are quenched by the electron donor. The photogenerated electrons are then directly transferred to the cofactor or electron mediator, catalyzing the reduction of cofactors. The reduced cofactors subsequently participate in the enzymatic catalysis process, and driving the reaction. Simultaneously, the cofactors are oxidized to the oxidation state. The oxidized cofactor can be reduced by the photosensitive material again, thus sustainably driving the reaction. In some systems, the cofactor itself can also be used as a photosensitizer that can be converted into the reduced state (or the excited state) in presence of light and electron donors, and then drive the enzymatic catalysis reaction. This article reviews the recent progress in the construction of cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems from three aspects: (1) Nicotinamide cofactor regeneration-based solar-driven enzymatic catalysis systems, (2) flavin cofactor regeneration-based solar-driven enzymatic catalysis systems, and (3) an emerging type of solar-driven enzymatic catalysis system, in which the cofactor itself can be a photosensitizer, excited by light and driving the enzymatic reaction. Owing to the important role of electron donors in cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems, we also introduce various electron donors and discuss which kind of electron donors is more appropriate for the cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems. Finally, we illustrate the challenges and problems in the field of cofactor-based solar-driven enzymatic catalysis systems and discuss potential ways to address these problems.

enzymatic catalysis, cofactors, cofactor regeneration, photocatalysis, light driven enzymatic catalysis systemdoi: [10.1360/TB-2020-0610](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0610)