

· 综 述 ·

甲酸脱氢酶及其在手性生物制造中的应用

程峰^{1,2}, 魏澜^{1,2}, 王成娇^{1,2}, 薛亚平^{1,2}, 郑裕国^{1,2}

1 浙江工业大学 生物有机合成技术研究浙江省重点实验室, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

程峰, 魏澜, 王成娇, 薛亚平, 郑裕国. 甲酸脱氢酶及其在手性生物制造中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(2): 632-649.

CHENG F, WEI L, WANG CJ, XUE YP, ZHENG YG. Formate dehydrogenase and its application in biomanufacturing of chiral chemicals. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 632-649.

摘 要: 氧化还原生物合成体系在绿色生物制造手性化合物中具有重要应用价值。甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH) 能氧化甲酸盐生成二氧化碳, 同时将 NAD(P)^+ 还原为 NAD(P)H , 是氧化还原生物合成中辅酶再生体系的关键酶。但天然的 FDH 催化效率低、稳定性差、辅酶利用率不高等缺点制约了其在工业生产中的应用。文中着重介绍了 FDH 的结构特征、催化机制以及不同来源 FDH 在酶活、催化效率、稳定性及辅酶偏好性改造方面的研究进展, 同时总结了利用 FDH 作为辅酶再生系统进行绿色生物制造手性化合物的应用实例。

关键词: 甲酸脱氢酶; 分子改造; 氧化还原生物合成; 绿色生物制造

Formate dehydrogenase and its application in biomanufacturing of chiral chemicals

CHENG Feng^{1,2}, WEI Lan^{1,2}, WANG Chengjiao^{1,2}, XUE Yaping^{1,2}, ZHENG Yuguo^{1,2}

1 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: The redox biosynthesis system has important applications in green biomanufacturing of chiral compounds. Formate dehydrogenase (FDH) catalyzes the oxidation of formate into carbon dioxide, which is associated with the reduction of NAD(P)^+ into NAD(P)H . Due to this property, FDH is

Received: April 7, 2021; **Accepted:** June 24, 2021; **Published online:** July 15, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31970046, 21978268)

Corresponding author: XUE Yaping. Tel: +86-571-88320391; Fax: +86-571-88320614; E-mail: xyp@zjut.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31970046, 21978268)

used as a crucial enzyme in the redox biosynthesis system for cofactor regeneration. Nevertheless, the application of natural FDH in industrial production is hampered by low catalytic efficiency, poor stability, and inefficient coenzyme utilization. This review summarized the structural characteristics and catalytic mechanism of FDH, as well as the advances in protein engineering of FDHs toward improved enzyme activity, catalytic efficiency, stability and coenzyme preference. The applications of using FDH as a coenzyme regeneration system for green biomanufacturing of chiral compounds were summarized.

Keywords: formate dehydrogenase; molecular modification; redox biosynthesis; green biomanufacturing

手性化学品被广泛应用于医药、农业、食品、材料等领域, 在国计民生中占据极其重要的地位^[1]。绿色生物制造手性化学品(手性生物制造)通过工业生物技术实现绿色清洁的生产工艺, 是手性化合物制造产业转型升级的“绿色动力”^[2]。氧化还原酶大多依赖辅酶 NADPH 或 NADH 进行催化反应, 是手性化合物合成的重要生物催化剂^[3-4], 然而辅酶会随着产物的生成而消耗, 同时 NAD(P)H 的高成本阻碍了其大规模生产^[5-6]。因此可以在反应系统中加入第二种氧化还原酶, 以牺牲廉价的底物回收辅因子, 构建一个高效、低成本的辅因子再生体系^[7-8]。在绿色生物制造中, 辅酶再生体系已被广泛应用于生产手性氨基酸、手性羧酸、手性醇、手性胺等多类手性化合物^[9-11]。

目前, 已被用于辅酶再生体系的烟酰胺类氧化还原酶有葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH)^[12]、甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH)^[13]、醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH)^[14]等。其中, FDH 催化甲酸盐生成 CO₂, 同时将 NAD(P)⁺还原为 NAD(P)H^[7], 其构筑的氧化还原生物合成体系具有如下优势^[15]: (1) 甲酸盐价格低廉, 工业上能够有效控制成本; (2) 甲酸盐是一种小分子, 容易透过细胞膜进入细胞, 提高了辅酶再生的效率; (3) 副产物仅为 CO₂, 易被排出反应体系, 保证了产品纯度, 并且 CO₂是惰性的,

不会抑制生产酶的活性; (4) FDH 的最适 pH 范围较广, 一般在 6.0–9.0 之间, 扩大了其操作范围。因此, FDH 在绿色生物制造领域具有重要的应用价值和工业化前景。

但是, 目前所挖掘的大部分 FDH 活力较低 (≤ 10 U/mg)、热稳定性较差以及仅对辅因子 NAD⁺具有依赖性^[15-16]。因此, 研究人员正通过基因工程等手段尝试解决这些问题, 为生物制造提供催化效率高、稳定性强的辅酶再生体系。本文综述了 FDH 在酶学性质测定和分子改造方面的研究进展以及 FDH 辅酶再生体系在绿色生物制造手性化合物中的应用。

1 甲酸脱氢酶简介

甲酸脱氢酶可以分为 2 类^[17]: 第一类酶蛋白中含有金属离子, 如活性中心存在钨、铁、硫、铜、硒等, 这类 FDH 在蛋白结构、分子量及稳定性等方面有很大差异; 第二类是 NAD⁺依赖型 FDH (EC 1.17.1.9) 和 NADP⁺依赖型 FDH (EC 1.17.1.10), 这类酶不含金属离子, 可以氧化甲酸盐为 CO₂, 同时将 NAD(P)⁺还原为 NAD(P)H (图 1), 是最主要的一类 FDH。目前, FDH 已经在多种生物中被发现, 如细菌^[18]、真菌^[19-20]等。

1.1 甲酸脱氢酶序列、结构特性分析

通过对数据库中已有的甲酸脱氢酶序列进行比对发现, FDH 若为同一种属, 同源性至少

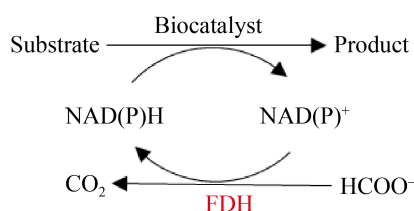


图1 FDH 辅酶再生系统

Figure 1 FDH cofactor regeneration system.

为 80%；若不属于同一种属，其同源性也在 50%–55% 之间，可见 FDH 是一种序列相对保守的酶^[15]。大部分 FDH 中半胱氨酸残基的数量在每亚基 2–9 个之间。天然 FDH 稳定性较差主要是由半胱氨酸残基的化学修饰或氧化引起的^[15]，已有研究证明，半胱氨酸残基的定点突变能够增强 FDH 对反应及其反应化合物的稳定性^[21–22]。

一般来说，FDH 是由 2 个相同亚基组成的二聚体，每个亚基包含 2 个结构域^[23]：辅酶结合结构域和底物结合结构域，每个结构域都由交替的 α 螺旋和 β 折叠组成，这种结构被称为 Rossmann 折叠。NAD⁺ 依赖型 FDH 有一个重要

特征，它的辅酶结合结构域中存在保守的 GxGxxGx_{17–18}D (E) 序列 (x 为任何残基)，属于经典的 Rossmann 折叠 (图 2)^[23–24]。带负电荷的天冬氨酸或谷氨酸残基是辅因子识别的决定因素，它与 NAD⁺ 腺苷核糖的 2'-和 3'-羟基相互作用，并排斥 NADP⁺ 的带负电荷的磷酸基团^[25]。基于近些年的文献报道和 NCBI 数据库，本文在表 1 中列出了 FDH 的不同来源及已解析的蛋白质三维结构 PDB 号。

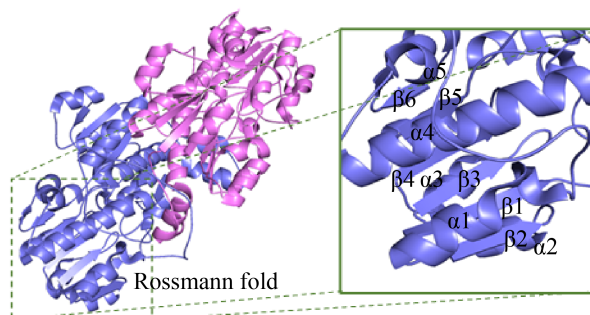


图2 NAD⁺依赖型 FDH 结构图

Figure 2 Diagram of the structure of NAD⁺ dependent FDH structure diagram.

表1 FDH 的来源及蛋白质三维结构 PDB 号

Table 1 The origin of FDH and the corresponding protein Data Bank ID

Domain	Organisms	PDB ID	References
Bacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. 101	2GO1, 2NAC, 6JUI, 6JUK, 2GUG	[26]
	<i>Mycobacterium vaccae</i> N10	–	[18]
	<i>Moraxella</i> sp. C2	2GSD, 3FN4	[18]
	<i>Burkholderia stabilis</i> 15516	–	[27]
	<i>Granulicella mallensis</i> MP5ACTX8	6T8C, 6T9X	[28]
	<i>Lactobacillus buchneri</i> NRRL B-30929	–	[29]
Fungi	<i>Candida boidinii</i>	5DN9, 2J6I, 2FSS, 6D4B, 6D4C	[30]
	<i>Candida methylica</i>	–	[20]
	<i>Pichia pastoris</i>	–	[31]
	<i>Pichia pestrie</i> NRRL-Y-7556	–	[32]
	<i>Aspergillus nidulans</i>	–	[33]
	<i>Neurospora crassa</i>	–	[19]

1.2 甲酸脱氢酶的催化机理

1.2.1 含金属离子的甲酸脱氢酶

这类 FDH 是催化甲酸盐转化为 CO_2 的金属酶，然而这一过程的反应机理尚不十分清楚。Dong 等^[34]提出了 5 种假定的机制，结合量子力学和分子动力学 (QM/MM) 优化，获得了粗略的催化模型。为了更精确详细描述催化过程中的能量变化，他们对催化口袋大区域 (1 121 个原子) 进行了 QM 计算，发现可能的精细机制是：Mo 进入 FDH 的氧化活性位点时，底物甲酸盐并不直接与 Mo 作用，而是在第二个配体附近。含硫配体从底物中结合氢离子，使

Mo(IV)-SH 和硫代碳酸盐离子连接到 Cys196 位点。当活性部位被氧化回到静息 (Mo^{VI}) 状态时，释放 CO_2 ^[34]。

1.2.2 不含金属离子的甲酸脱氢酶

NAD^+ 依赖型 FDH 由 2 个相同亚基组成，不含金属离子，对甲酸盐和 NAD^+ 具有高度依赖性。当甲酸盐进入 FDH 活性口袋时，带负电荷的 COOH^- 与 284 位精氨酸的侧链相互作用，形成盐桥，并与 Asn146 的侧链形成氢键。甲酸盐的氢离子转移到 NAD^+ 的吡啶环的 C4 原子上，同时将 NAD^+ 还原为 NADH ，并释放 CO_2 ^[35-36] (图 3)。

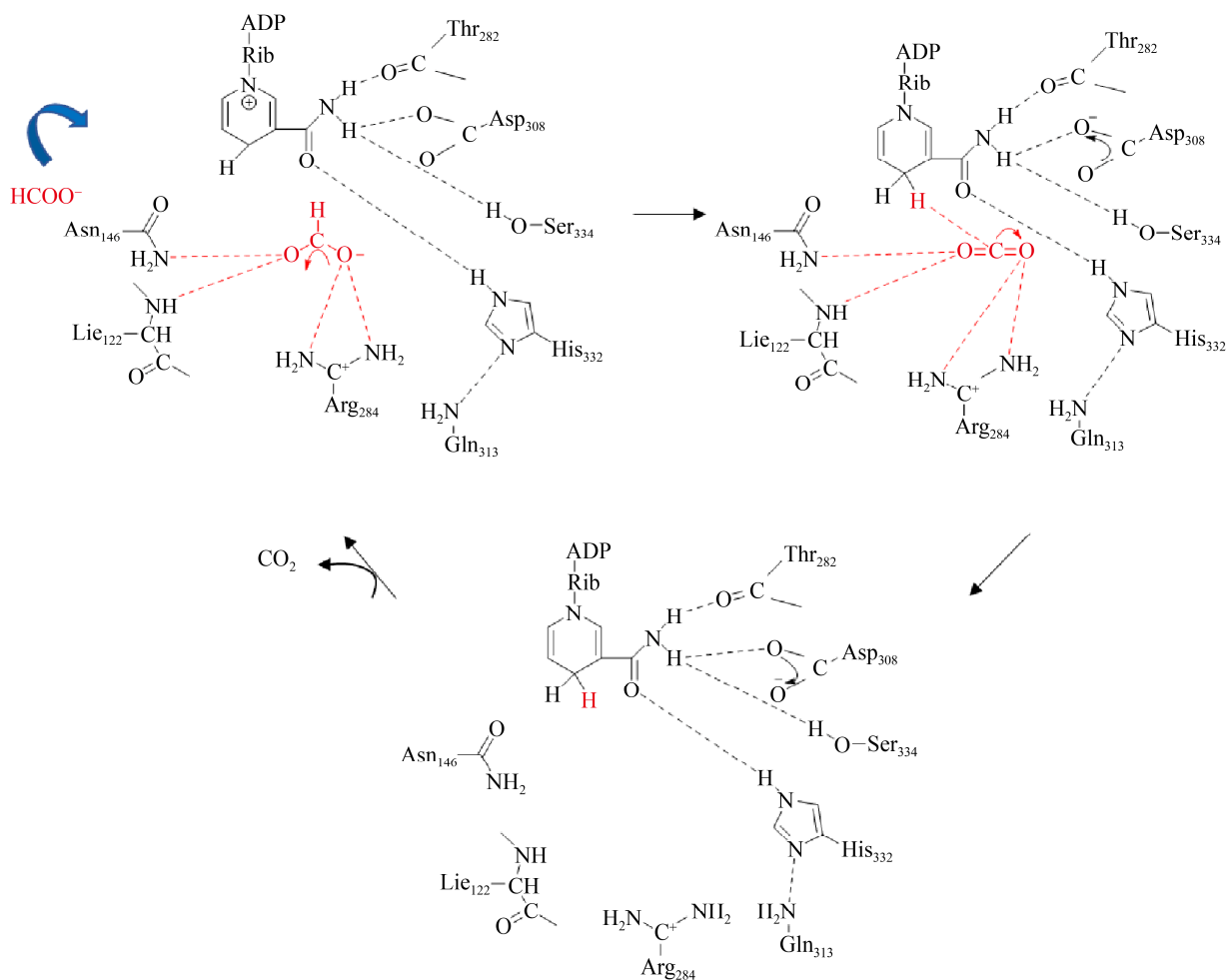


图 3 NAD^+ 依赖型 FDH 的催化机制^[35-36]

Figure 3 Catalytic mechanism of NAD^+ -dependent FDH^[35-36].

2 FDH 的分子改造及酶学性质研究

2.1 分子改造提高 FDH 的催化效率

FDH 作为辅酶再生系统的研究热点, 与 GDH 和 ADH 等酶相比存在酶活相对较差等应用瓶颈。因此, 寻找催化效率高的 FDH 成为目前研究的重点。

2.1.1 提高 NAD⁺依赖型 FDH 的催化效率

为了获取具有更高 NAD⁺活性的 FDH, 厦门大学方柏山教授课题组^[37]将博伊丁假丝酵母菌 (*Candida boidinii*) FDH (*Cbo*FDH) 与其他 FDH 的空间结构进行比对, 基于结构分析和理性设计对靠近酶活性位点的 V120 和靠近辅酶结合区的 N187 残基进行定点突变, 得到了 2 个单突变体 (V120S、N187D) 和 1 个双突变体 (V120S/N187D)。其中 *Cbo*FDH V120S/N187D 突变体增强了对 NAD⁺的亲和力 (表 2), 在 187 位引入带负电荷的天冬氨酸, 使其更易与带正电荷的辅酶结合, 对辅酶的催化效率提高了 50%。

Alekseeva 等^[38]将 A198G 取代引入假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 101 FDH 中, 减小了 198 位点与辅酶之间的构象张力, 突变体 *Pse*FDH A198G 的 $K_m^{NAD^+}$ 为 (0.035±0.002) mmol/L, 与

野生型相比下降了 42% (*Pse*FDH WT 的 $K_m^{NAD^+}$ 为 (0.060±0.005) mmol/L), 但几乎没有改变其对甲酸盐的亲和力 (表 2)。

2.1.2 提高 NADP⁺依赖型 FDH 的催化效率

还原型烟酰胺腺嘌呤磷酸二核苷酸 (NADPH) 是所有真核生物、细菌和古菌的基本电子供体^[39], 许多工业化物质的生产过程往往涉及 NADPH 依赖型的酶, 这也奠定了 NADPH 在工业生物合成中广泛应用的基础^[40]。

来自洋葱伯克氏霍尔德菌 (*Burkholderia stabilis*) 15516 的甲酸脱氢酶 (*Bst*FDH) 是首个报道的天然 NADP⁺依赖型 FDH, 与其他利用 NADP⁺作为氢受体的 FDH 相比, 它对底物和辅因子的亲和力都较低, 应用较为困难。华东理工大学许建和、郑高伟教授课题组^[27]为提高 FDH 对 NADP⁺和 HCOO⁻的亲和力, 通过序列比对和结构分析筛选有义突变位点(图 4), 得到突变体 *Bst*FDH G146M/A287G, 使 $K_m^{NADP^+}$ 降低至 0.09 mmol/L (*Bst*FDH WT 为 0.19 mmol/L), 同时 $K_m^{HCOO^-}$ 也由 (51.8±4.4) mmol/L 降低为 (31.7±3.7) mmol/L, 相应地 $k_{cat}/K_m^{NADP^+}$ 提高为野生型的 1.6 倍 (表 3)。

表 2 NAD⁺依赖型甲酸脱氢酶野生型及突变体的动力学参数比较

Table 2 Kinetic parameters of native NAD⁺-dependent FDHs and their mutants

Enzymes	NAD ⁺			Formate			References
	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	
<i>Cbo</i> FDH WT	3.400±0.150	22.300±0.550	6.559	3.630±0.100	1.530±0.035	0.423	[37]
<i>Cbo</i> FDH V120S	8.810±0.180	40.630±12.100	4.612	7.900±0.320	5.340±0.210	0.676	[37]
<i>Cbo</i> FDH N187D	3.800±0.220	28.990±0.056	7.629	6.700±0.210	3.290±0.090	0.491	[37]
<i>Cbo</i> FDH V120S/N187D	2.020±0.110	18.680±0.390	9.248	2.500±0.150	0.700±0.010	0.280	[37]
<i>Pse</i> FDH WT	0.060±0.005	7.300±0.200	121.667	6.500±0.200	–	–	[38]
<i>Pse</i> FDH A198G	0.035±0.002	7.300±0.100	208.571	7.500±0.200	–	–	[38]
<i>Mor</i> FDH WT	0.080±0.007	7.300±0.100	91.250	7.700±0.300	–	–	[38]
<i>Mor</i> FDH A198G	0.045±0.003	7.300±0.300	162.222	8.000±0.500	–	–	[38]
<i>Bst</i> FDH WT	1.430	1.660±0.100	1.161	≥150	–	–	[41]
<i>Cme</i> FDH WT	0.055	1.400	25.455	–	–	–	[38]
<i>Gra</i> FDH WT	6.500	5.770	0.888	80.000	–	–	[28]
<i>Scf</i> FDH WT	0.036	6.500±0.400	180.555	5.500±0.300	–	–	[35]

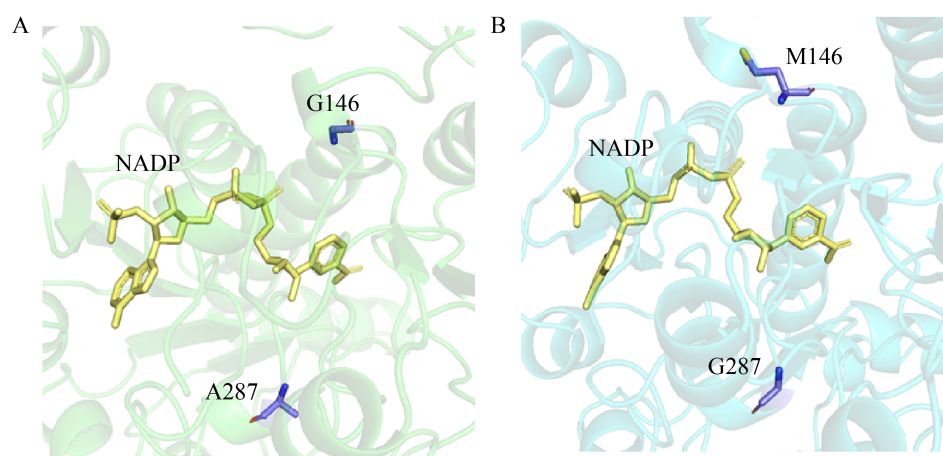


图 4 *Bst*FDH 与 NADP 复合体结构示意图^[27] A: *Bst*FDH WT 结构图; B: *Bst*FDH G146M/A287G 结构图

Figure 4 Structure diagram of *Bst*FDH containing NADP^[27]. (A) *Bst*FDH WT. (B) *Bst*FDH G146M/A287G.

表 3 NADP⁺依赖型甲酸脱氢酶野生型及突变体的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of native NADP⁺-dependent FDHs and their mutants

Enzymes	NADP ⁺			Formate			References
	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	
<i>Bst</i> FDH WT	0.190±0.010	10.500±0.200	55.263	51.800±4.4	10.400±0.200	0.201	[27]
<i>Bst</i> FDH G146M/A287G	0.090	8.820±0.030	98.000	31.700±3.7	8.710±0.220	0.275	[27]
<i>Lb</i> FDH WT	0.120	3.510	29.250	49.800	2.500	0.050	[29]
<i>Gra</i> FDH WT	0.850	3.960	4.659	200.000			[28]
<i>Lj</i> FDH WT	29.500	0.005	0.001	6.100	1.300	0.213	[42]
<i>Cbo</i> FDH	0.029	0.790	27.241	–	–	–	[30]
D195Q/Y196R/Q197N							
<i>Myc</i> FDH 3M (C145S/D221Q/C255V)	0.920±0.100	7.890±1.260	8.576	113.000	–	–	[43]
<i>Myc</i> FDH 4M (C145S/ A198G/D221Q/C255V)	0.147±0.020	3.080±0.100	20.952	98.000±13.000	–	–	[43]
<i>Pse</i> FDH V9 (A198Q/D221Q/C255A/ H379K/S380V)	0.026±0.001	3.690±0.030	141.923	24.000±2.400	3.600±0.100	0.150	[26]

2.1.3 不同来源 FDH 的动力学参数测定

根据近些年文献报道, 本文将不同来源的 NADP⁺依赖型 FDH 的野生型及突变体的动力学参数进行总结, 如表 2 所示, 目前 FDH 的 $K_m^{NAD^+}$ 在 (0.035–8.810) mmol/L 之间, $k_{cat}^{NAD^+}$ 在 (1.40–40.63) s⁻¹ 之间。其中, 来源为 *Pseudomonas* sp. 101 的野

生型 FDH 对 NADP⁺ 的催化效率最高, 其突变体 *Pse*FDH A198G 在目前已报道的 NADP⁺ 依赖型 FDH 中催化效率最高。

本文进一步对 NADP⁺ 依赖型 FDH 的野生型和突变体的动力学参数进行总结 (表 3), 目前 FDH 的 $K_m^{NAD^+}$ 在 (0.026–29.500) mmol/L 之

间, $k_{\text{cat}}^{\text{NADP}^+}$ 在 (0.005–8.820) s^{-1} 之间。野生型 FDH 中对 NADP^+ 亲和力最高的是布氏乳杆菌 *Lb*FDH, 其 $K_{\text{m}}^{\text{NADP}^+}$ 为 0.12 mmol/L, 催化效率为 29.25 L/(mmol·s)。PseFDH V9 为目前对 NADP^+ 亲和力最强、催化效率最高的 FDH 突变体。

2.2 分子改造改善 FDH 的稳定性

在反应过程中, 酶活性的丧失通常与催化过程的化学修饰和热变性有关。半胱氨酸残基是 FDH 中最关键的残基, 因为在几乎所有的 FDH 中, 半胱氨酸残基在酶活性中起着重要的作用。FDH 中的半胱氨酸残基的存在能够使巯基被氧化^[44], 导致 FDH 失活。大多数情况下, 低于 40 °C 的变性也是由半胱氨酸残基的化学修饰或氧化引起的^[43]。

2.2.1 C145 和 C255 位点对 PseFDH 和 MycFDH 稳定性的影响

PseFDH 和来自母牛分枝杆菌 (*Mycobacterium vaccae*) N10 的 MycFDH 只有 2 个氨基酸残基不同, 同源性达 99.5%。对 PseFDH 的结构进行分析, 每个亚基上有 7 个半胱氨酸残基, 分别在 5、145、182、248、255、288 和 354 位 (图 5)。Tishkov 等^[45]发现 PseFDH 突变体 C255S 和 C255M 的化学稳定性与野生型相比提高了 2 个数量级, 然而这两种突变影响了 FDH 与辅酶 NAD^+ 的结合。Savin 等^[44]通过研究发现, PseFDH 野生型对 H_2O_2 不稳定, 用 Ala 替代 Cys255 使失活速率常数降低了 50%, 同时提高了该酶的热稳定性; 进一步引入 C145S 位点的突变, 形成的 PseFDH C145S/C255A 突变体对 H_2O_2 稳定性最高, 其失活速率常数降低了 95%。Hoelsch 等^[43]对 MycFDH 也进行了类似突变, 在 MycFDH A198G/D221Q 的基础上对 2 个半胱氨酸残基进行定点突变 (C145S/C255V), 不仅提高了其对 4-氯乙酰乙酸乙酯 (ethyl 4-chloroacetoacetate,

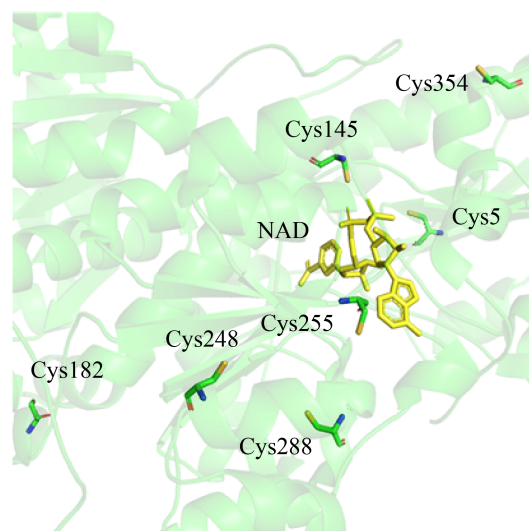


图 5 PseFDH 中半胱氨酸残基的位点示意图
Figure 5 Structure diagram of cysteine residues in PseFDH.

ECAA) 的耐受性, 而且催化效率也提高为原来的 6 倍。该突变体在 30 °C、pH 7.0 的条件下, $K_{\text{m}}^{\text{NADP}^+}$ 为 (0.147±0.02) mmol/L。

2.2.2 C23 和 C262 位点对 CboFDH 稳定性的影响

CboFDH 的每个亚基包含 2 个半胱氨酸残基, 即 Cys23 和 Cys262, 其中的巯基容易被氧化。为了得到稳定性更高的 CboFDH, Slusarczyk 等^[21]构建了 CboFDH C23S 和 CboFDH C23S/C262A 突变体, 在 Cu(II) 存在的条件下这两个突变体的酶活都没有受到影响, 反应的最适温度和动力学参数也没有明显改变, 而野生型酶活下降至 15%–30%左右。

2.3 分子改造转变 FDH 的辅酶偏好性

尽管 NAD^+ 和 NADP^+ 的结构相似, 但大部分 FDH 仅对上述 2 种辅酶其中的 1 种表现出显著的偏好性^[46]。目前, 大约 80% 的野生型 FDH 是典型的 NAD^+ 依赖型, 仅少数为 NADP^+ 依赖型^[28-29], 这也阻碍了 FDH 在 NADPH 再生系

统中的应用,因此改变 FDH 的辅酶偏好性具有极其重要的意义。

近年来,很多文献报道了反转 FDH 辅酶偏好性的实例,但改造后的 FDH 催化效率以及对底物的亲和力仍不理想^[38,47]。有研究认为,理性设计或定向进化几乎无法产生 k_{cat} 更高的 NADP⁺依赖型 FDH 突变体^[5],因此获得高效的 NADP⁺依赖型 FDH 需要从高活力 NAD⁺依赖型 FDH 出发改造其辅酶偏好性。

2.3.1 转变 *Cbo*FDH 的辅酶偏好性

*Cbo*FDH 的辅酶偏好性已被广泛研究,其单突变体 D195S、双突变体 D195S/Y196H 和三突变体 D195S/Y196H/K356T 对 NAD⁺的酶活(野生型为 2.2 U/mg)分别为 1.5、1.3、1.3 U/mg,它们对 NADP⁺的酶活从 0.001 3 分别增加到 0.083、0.190、0.360 U/mg^[15]。

Wu 等^[30]通过结构和功能分析,推测 *Cbo*FDH 的 Asp195、Tyr196 和 Gln197 残基在识别辅因子方面发挥关键作用(图 6)。因此同

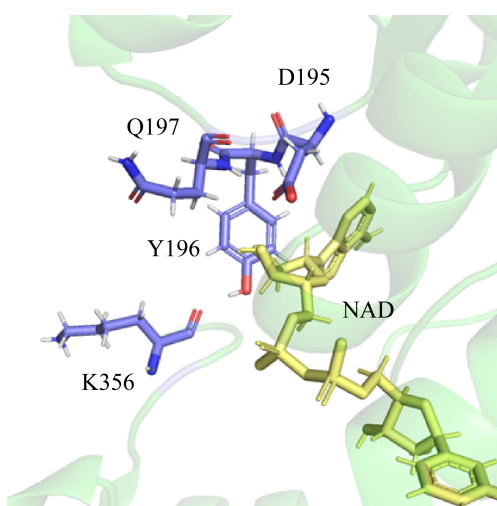


图 6 *Cbo*FDH 中关键氨基酸残基与 NAD 的结构示意图^[30]

Figure 6 Structure diagram of key amino acid residues and NAD in *Cbo*FDH^[30].

时对 *Cbo*FDH 的 Asp195 和 Tyr196 残基进行位点饱和突变,经筛选得到两个对 NADP⁺偏好性提高的突变体 D195Q/Y196R 和 D195S/Y196P,其动力学参数如表 4 所示。进一步,在 D195Q/Y196R 的基础上引入 Q197 位点的突变,以天冬酰胺代替 197 位的谷氨酰胺,该突变体对 NADP⁺的 K_m 下降到 0.029 mmol/L,是 *Cbo*FDH D195Q/Y196R 的一半。

2.3.2 转变 *Pse*FDH 的辅酶偏好性

2006 年, Tishkov 等^[48]报道了辅酶特异性由 NAD⁺转变为 NADP⁺的突变体 *Pse*FDH T5M8,它在 NADP⁺条件下的酶活是 NAD⁺的 3.5 倍,被用于合成手性醇和内酯^[49-50]。野生型 *Pse*FDH 在 pH 6.0–9.0 之间时 $K_m^{\text{NAD}^+}$ 不变;而该突变体 T5M8 只有在 pH 值为 6.0–7.0 才能与辅酶结合, pH 值在 8.0 时,其 $K_m^{\text{NADP}^+}$ 增加了 10 倍以上^[48]。为了解决这个问题,该实验室创建了第二代和第三代突变体 *Pse*FDH T5M9 和 *Pse*FDH T5M10,将其与 NADP⁺结合的最适 pH 扩大至 6.0–9.0 和 6.0–10.0。

Alekseeva 等^[38]发现 D221S 可以使 *Pse*FDH 对 NAD⁺的亲和力降低,并增加其对 NADP⁺的亲和力 ($K_m^{\text{NADP}^+}$ 为 0.19 mmol/L),如果同时引入突变 A198G 则可以提高对 NADP⁺的催化效率(表 4)。近期, Calzadiaz-Ramirez 等^[26]通过同时突变多个氨基酸残基构建了一个 $>10^6$ 的突变体文库,通过筛选得到一系列 FDH 突变体,这些突变体都表现出对 NADP⁺的高亲和力, $K_m^{\text{NADP}^+}$ 值在 0.026–0.130 mmol/L 之间(表 4)。*Pse*FDH V9 在这些突变体中动力学参数最佳,其 $K_m^{\text{NADP}^+}$ 为 0.026 mmol/L, $k_{\text{cat}}/K_m^{\text{NADP}^+}$ 为 141.923 L/(mmol·s) (*Pse*FDH WT 的 $k_{\text{cat}}/K_m^{\text{NAD}^+}$ 为 121.667 L/(mmol·s)),同时该突变体对甲酸盐的亲和力和催化效率也有所提升。如图 7 所示,

表 4 由 NAD⁺依赖型转变为 NADP⁺依赖型甲酸脱氢酶野生型及突变体的动力学参数
Table 4 Kinetic parameters of NAD⁺- and NADP⁺-dependent FDH and their mutants

Enzymes	NADP ⁺			NAD ⁺			References
	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	
<i>Cbo</i> FDH WT	–	–	–	0.051±0.006	3.400±0.070	66.667	[30]
<i>Cbo</i> FDH D195Q/Y196H	1.700±0.080	0.440±0.030	0.259	1.800±0.090	0.490±0.030	0.272	[51]
<i>Cbo</i> FDH D195Q/Y196R	0.050±0.010	0.570±0.040	11.400	0.084±0.009	0.450±0.010	5.357	[30]
<i>Cbo</i> FDH D195S/Y196P	0.110±0.030	0.310±0.030	2.818	0.196±0.03	3.140±0.130	16.020	[30]
<i>Cbo</i> FDH D195Q/Y196R/Q197N	0.029±0.005	0.790±0.020	27.241	0.360±0.03	0.620±0.030	1.722	[30]
<i>Pse</i> FDH WT	100.000	1.300±0.100	0.013	0.060±0.005	7.300±0.200	121.667	[38]
<i>Pse</i> FDH D221S	0.190±0.030	1.700±0.200	8.947	0.710±0.045	5.000±0.300	7.042	[38]
<i>Pse</i> FDH A198G/D221S	0.280±0.025	1.800±0.200	6.429	0.540±0.042	5.000±0.200	9.259	[38]
<i>Pse</i> FDH A198G/D221Q	0.067±0.009	3.000±0.100	44.776	1.300±0.400	1.200±0.100	0.923	[26]
<i>Pse</i> FDH A198G/D221Q/C255A	0.120±0.020	2.00±0.100	16.667	4.600±0.700	1.420±0.080	0.309	[26]
<i>Pse</i> FDH A198G/D221Q/C255A/ S380V	0.057±0.004	2.090±0.050	36.667	7.800±1.400	0.760±0.070	0.097	[26]
<i>Pse</i> FDH V9 (A198Q/D221Q/C255A/ H379K/S380V)	0.026±0.001	3.690±0.030	141.923	5.400±0.700	1.500±0.100	0.278	[26]
<i>Myc</i> FDH WT	> 40.000	–	–	–	–	–	[43]
<i>Myc</i> FDH 3M (C145S/D221Q/C255V)	0.920±0.100	7.890±1.260	8.576	1.090±0.040	8.220±0.100	7.541	[43]
<i>Myc</i> FDH 4M (C145S/A198G/ D221Q/C255V)	0.147±0.020	3.080±0.100	20.952	4.100±0.170	5.180±0.090	1.263	[43]
<i>Cme</i> FDH WT	–	–	<10 ⁻⁶	0.620±0.300	0.200±0.100	0.323	[16]
<i>Cme</i> FDH 195S	5.00±1.200	0.040±0.090	0.008	1.100±0.500	0.220±0.100	0.200	[16]
<i>Cme</i> FDH D195S/Q197T	4.600±3.000	0.260±0.100	0.056	0.220±0.030	0.200±0.010	0.909	[16]
<i>Cme</i> FDH D195S/Y196L	2.000±0.600	0.100±0.020	0.050	0.700±0.200	0.200±0.100	0.286	[16]

该突变体的 5 个位点均在辅酶附近，A198 位被甘氨酸取代，为辅因子 NADP⁺提供了更多空间；D221 突变为谷氨酰胺消除了天冬氨酸与磷酸基团的静电排斥作用；H379 被赖氨酸取代，与 NADP⁺的 2'-磷酸基团建立了盐桥；C255A 突变位于辅因子周围，丙氨酸取代体

积较大的半胱氨酸为这个区域提供了更多空间；S380V 突变引入了脂肪族侧链，提高了结合口袋区域的疏水性。该突变体不仅改变了辅酶偏好性而且保留了野生型 *Pse*FDH 的高催化效率，成为目前动力学参数最佳的 NADP⁺依赖型 FDH。

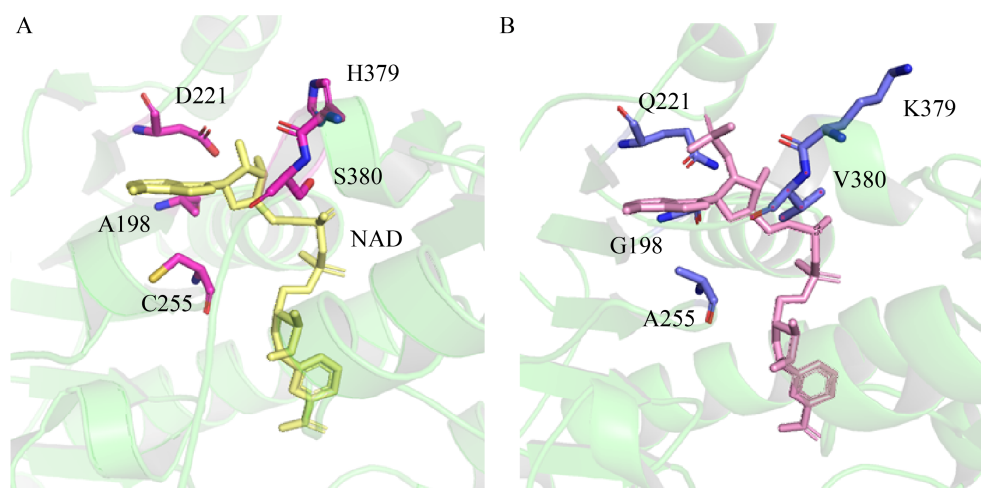


图7 *PseFDH* 结构示意图 A: 含有 NAD 的 *PseFDH* 结构图; B: 含有 NADP 的 *PseFDH* V9 结构图, 改编自[26]

Figure 7 Structure diagram of *PseFDH* containing NAD (A) or *PseFDH* V9 containing NADP (B), adapt from [26].

2.3.3 转变 *MycFDH* 的辅酶偏好性

Hoelsch 等^[43]为得到催化效率高的 NADP^+ 依赖型的 FDH, 利用基因工程方法对 *MycFDH* 进行改造, 辅酶附近的关键残基如图 8 所示。得到的 *MycFDH* 3M 是当时活力最高的 NADP^+ (10.25 U/mg) 依赖型 FDH, 但 $K_m^{\text{NADP}^+}$ 比 *MycFDH* 4M 高了一个数量级 (表 4)。 *MycFDH* 4M 在 30 °C、pH 为 7.0 的条件下 V_{\max} 为 4.00 U/mg, $K_m^{\text{NADP}^+}$ 降低至 0.147 mmol/L (*MycFDH* WT 为 40 mmol/L), 对 NADP^+ 催化效率显著提高。实验结果表明, *MycFDH* 3M 对 NAD^+ 和 NADP^+ 的动力学参数几乎相同, 是双依赖型突变体。当反应体系需要 NADH 和 NADPH 同时再生时, *MycFDH* 3M 将成为一种更有效的催化剂。

2.3.4 转变 *CmeFDH* 的辅酶偏好性

Gul-Karaguler 等^[47]曾报道过一种来源于甲基假丝酵母菌 (*Candida methyllica*) 的 *CmeFDH* 的单突变体 *CmeFDH* D195S, 与野生型有相似的 $K_m^{\text{NAD}^+}$, 该突变体虽然能够催化 NADP^+ 进行反应, 但突变体对 NAD^+ 的催化效率 (k_{cat}/K_m) 仍比 NADP^+ 高 40 倍。

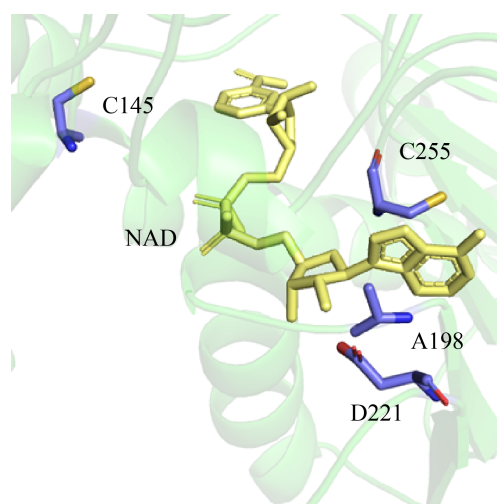


图8 *MycFDH*、辅酶及关键氨基酸残基的结构示意图

Figure 8 Structure diagram of *MycFDH* with coenzyme and key amino residues.

Özgül 等^[16]采用了理性设计和定向进化相结合的定点饱和突变的方法, 将 NAD^+ 依赖型 *CmeFDH* 的辅酶特异性改变为 NADP^+ 。在 *CmeFDH* 辅酶结合域的 195、196、197 位点进行两轮诱变和筛选, 得到的 *CmeFDH* D195S/Q197T 突变体对 NAD^+ 的催化效率较野

生型提高了 80%，同时对 NADP^+ 的催化效率提高为原来的 5.6×10^4 倍；*CmeFDH* D195S/Y196L 突变体对 NADP^+ 的催化效率提高为原来的 5×10^4 倍 (表 4)。

3 FDH 在手性生物制造中的应用

3.1 FDH 在手性氨基酸中的应用

早在 19 世纪末期，生物工程专家已构建了甲酸脱氢酶/亮氨酸脱氢酶 (leucine dehydrogenase, LeuDH) 的吨级酶生物反应器^[52]。近年来，基于 FDH 的辅酶再生系统在手性化合物合成中得到了广泛应用。例如，Liu 等^[53]报道了在 FDH 辅酶再生系统辅助下 LeuDH 催化 1.5 mol/L 三甲基丙酮酸转化为 L-叔亮氨酸的路线 (图 9)，其 6 h 转化率为 99%，时空产率为 786 g/(L·d)，产物 *e.e.* 值 > 99%。

L-2-氨基丁酸作为抗惊厥药物和抗结核药物的前体，是化学和制药工业的重要中间体。在亮氨酸脱氢酶催化 2-酮丁酸生成 L-2-氨基丁酸的反应中 (图 10)，笔者课题组^[54]构建了亮氨酸脱氢酶/甲酸脱氢酶共表达菌株，在不添加辅酶的情况下，180 g/L 的 L-苏氨酸在反应 8 h 后底物转化率达到 99%，产物 L-2-氨基丁酸的时空产率为 19.3 g/(L·h)，*e.e.* 值 > 99.5%。

L-草铵膦是大品种手性农药，目前市售的外消旋草铵膦中只有 L 构型具有除草效果，D 构型

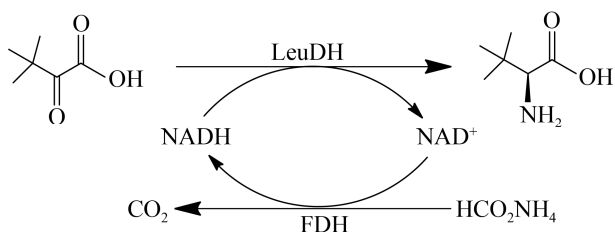


图 9 酶法合成 L-叔亮氨酸^[53]
Figure 9 Enzymatic preparation of L-tert-leucine^[53].

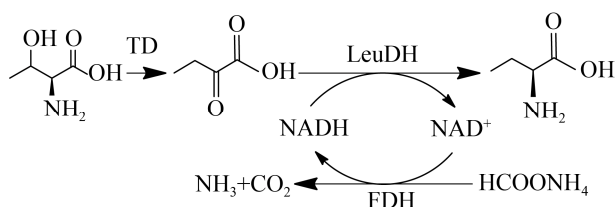


图 10 苏氨酸脱氢酶、亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶偶联催化合成 L-2-氨基丁酸工艺路线^[54]
Figure 10 Synthesis of L-2-aminobutyric acid by coupling TD, LeuDH and FDH^[54].

不仅没有除草效果还会对环境造成污染。笔者课题组以谷氨酸脱氢酶 (glufosinate dehydrogenase, GfDH) 为催化剂，不对称胺化 2-羧基-4-(羟基)-(-甲基氧磷基)-丁酸 (2-oxo-4-[(hydroxy)-(-methyl)phosphinyl]butyric acid, PPO) 生成 L-草铵膦^[55-56]，构建了甲酸脱氢酶 (*LbFDH*) 胞内辅酶再生体系 (图 11)，转化率为 99%，获得的 L-草铵膦 *e.e.* 值 > 99%^[55]。

江南大学聂尧教授课题组^[57]利用 D-氨基酸脱氢酶 (D-amino acid dehydrogenase, D-AADH) 与甲酸脱氢酶 (*BstFDH*) 构建了氧化-还原生物合成体系 (图 12)，80 mmol/L 的 L-苯丙氨酸反应 6 h 后加胺还原为 D-苯丙氨酸，转化率接近 100%，产物得率 > 91%，*e.e.* 值 > 99%。此外，该体系也能催化多种天然或非天然的 L-氨基酸合成相应的 D-氨基酸，包括 L-高苯丙氨酸、2-氯-L-苯丙氨酸、3-氯-L-苯丙氨酸、L-亮氨酸、

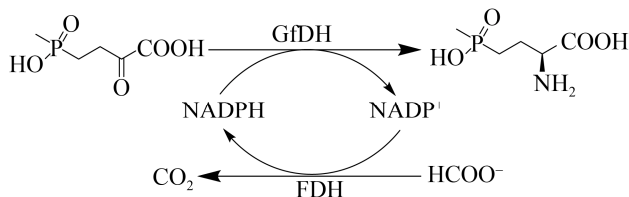


图 11 GfDH 催化 PPO 不对称还原生产 L-草铵膦^[55]
Figure 11 GfDH catalyzed PPO asymmetric reduction for the synthesis of L-phosphinothricin^[55].

L-正缬氨酸和 L-谷氨酸等, 大部分产物的 *e.e.* 值都大于 99%。

中国科学院天津工业生物技术研究所朱敦明、吴洽庆教授课题组^[58]构建了 L-苏氨酸裂解酶(L-threonine ammonialyase, L-TAL)、D-氨基酸脱氢酶与甲酸脱氢酶多酶催化合成 D-2-氨基丁酸的路线(图 13), 200 mmol/L 的 L-苏氨酸反应 24 h, 转化为 D-2-氨基丁酸的产率>90%, *e.e.*值>99%。

3.2 FDH 在手性羟酸中的应用

江南大学刘立明教授课题组^[59]构建了 2 个级联反应路线, 分别使 100 g/L 蛋氨酸前体酮在 *R*-立体选择性的脱氢酶/*Cbo*FDH 或 *S*-立体选

择性的脱氢酶/*Cbo*FDH 的作用下, 不对称还原生成(*R*)-羟基蛋氨酸(图 14A)或(*S*)-羟基蛋氨酸(图 14B), 反应 9 h 后的转化率均>95%, 产物的 *e.e.*值均>99%。

3.3 FDH 在手性醇中的应用

He 等^[60]构建了 (2*S*,3*S*)-2,3-丁二醇脱氢酶(BDH)/甲酸脱氢酶氧化-还原生物合成体系(图 15), 将 40 g/L 2,3-丁二醇催化合成 (2*S*,3*S*)-2,3-丁二醇, 反应 21 h 后产率>98%, *e.e.*值>98%。

3.4 FDH 在手性胺中的应用

Knaus 等^[61]描述了胺脱氢酶(amine dehydrogenases, AmDH)与甲酸脱氢酶组成的氧化-还原生物合成体系(图 16), 将 50 mmol/L

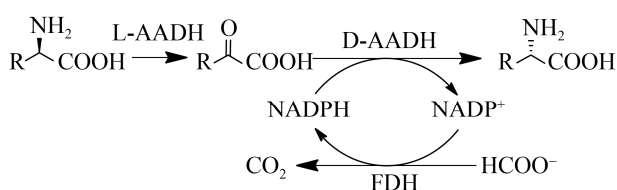


图 12 L-氨基酸合成 D-氨基酸^[57]

Figure 12 Synthesis of enantiomerically pure D-amino acids by L-amino-acid stereoinversion^[57].

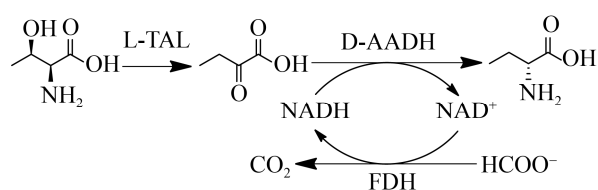


图 13 L-苏氨酸合成 D-2-氨基丁酸^[58]

Figure 13 Synthesis of D-2-aminobutyric acid from L-threonine^[58].

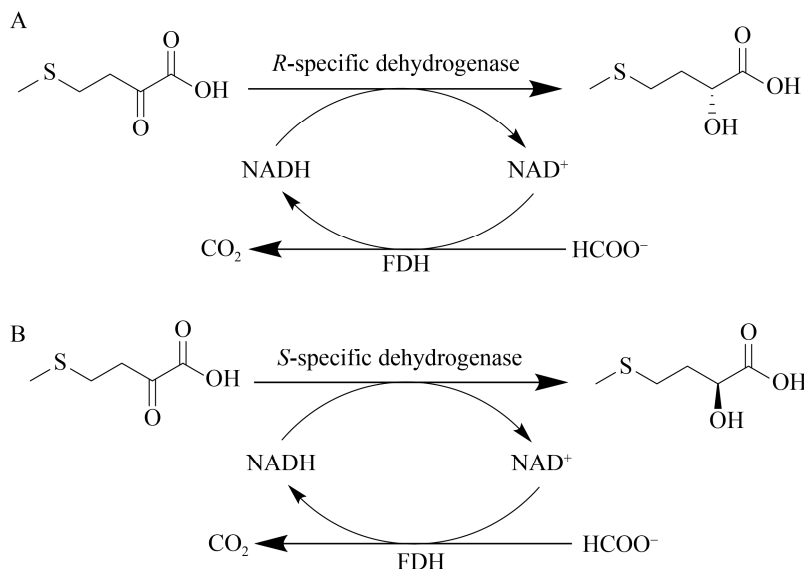


图 14 催化酮蛋氨酸生成 (*R/S*)-羟基蛋氨酸的路线^[59]

Figure 14 Bioconversion of (*R/S*)-2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid from ketonemethionine^[59].

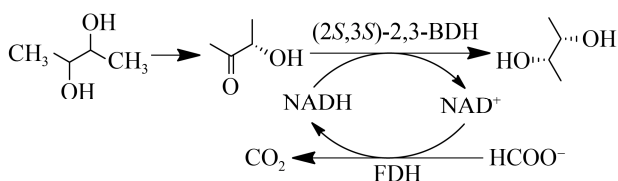


图 15 (2*S*,3*S*)-2,3-BDH 与 FDH 催化合成 (2*S*,3*S*)-2,3-丁二醇

Figure 15 Synthesis of citronellal from (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol by (2*S*,3*S*)-2,3-BDH and FDH.

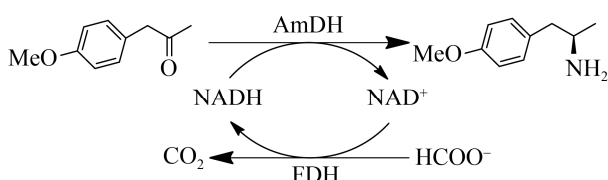


图 16 AmDH 与 FDH 催化合成 (*R*)-手性胺^[61]

Figure 16 Synthesis of (*R*)-amines catalyzed by AmDH and FDH^[61].

对甲氧基苯基丙酮转化为对应的 (*R*)-胺, 24 h 反应后转化率为 91%, 产物得率 82%, *e.e.*值>99%。

为了更直观地展示 FDH 在手性生物制造中的应用, 我们将手性化学品的生物制造具体参数总结于表 5, 包括了 FDH 的催化效率、产物的光学纯度, 以及生物催化的底物转化率 (或产物得率) 和时空产率。改造提高 FDH 的催化效率和稳定性能够显著提高手性生物制造的产物得率和时空产率, 贴近工业生产要求。例如, *MycFDH* C145S/D221Q/C255V 突变体不仅改变了 *MycFDH* 的辅酶偏好性, 提高其对 NADP^+ 的催化效率, 还提高了对 ECAA 的化学稳定性, 与 *MycFDH* D221G 构建的辅酶再生系统相比反应产率提高 39%^[43,62]。*LeuDh* 与 *FgFDH* 偶联合成 L-2-氨基丁酸^[54]的时空产率达到 463.2 g/(L·d), 比偶联 *GDH* 辅酶再生系统的生物合成体系提高 1 倍^[63-64]。*GDH* 辅酶再生系统具有再生效率高、辅底物 (葡萄糖) 价格低

廉等优点, 但葡萄糖同时被氧化并生成葡萄糖酸, 不仅使反应 pH 下降, 而且增加产物分离纯化的成本。据文献报道, 在生产 L-叔亮氨酸的工艺中, *LeuDh* 偶联 *GDH* 辅酶再生体系反应的时空产率虽然比偶联 *FDH* 辅酶再生体系高 20%, 但其产物分离纯化较困难^[53,65], 生产成本反而更高。*D*-氨基酰化酶 (*D*-aminoacylase, *D*-AA) 催化合成 *D*-氨基酸的合成路线无辅酶再生系统^[66], 24 h 转化率为 91.1%, *e.e.*值为 86.7%, 均低于 *D*-氨基酸脱氢酶 (*D*-AADH) 与 *FDH* 辅酶再生系统组合时的反应参数 (4 h 转化率为 100%, *e.e.*值大于 99%)。Wang 等^[67]报道 2,3-丁二醇催化合成 (2*S*,3*S*)-2,3-丁二醇的生物制造路线, 分别描述了无辅酶再生系统、*GDH* 辅酶再生系统和 *FDH* 辅酶再生系统对催化反应的影响, 结果如表 5 所示, 无辅酶再生系统的时空产率为 64.8 g/(L·d), 产物得率为 82.5%; *GDH* 和 *BDH* 共表达的时空产率为 67.2 g/(L·d), 产物得率为 85.4%; *FDH* 和 *BDH* 共表达的时空产率为 86.4 g/(L·d), 产物得率为 91.8%。由此可见, 引入辅酶再生系统可提高 (2*S*,3*S*)-2,3-丁二醇的产率, *FDH* 和 *BDH* 共表达可提高对 NADH 的利用率及手性化合物产率, 并且在该反应体系中无有机酸的产生, 使产物分离纯化更简便。

综上所述, *FDH* 已被广泛应用于生产手性氨基酸、手性羧酸、手性醇、手性胺等工业领域, 在氧化-还原生物合成体系中通过再生辅因子以减少 NAD(P)H 的外源添加量, 从而降低成本, 副产物 CO_2 可直接排出反应体系, 产物分离纯化更简单高效。由此可见, *FDH* 在氧化-还原生物合成体系中的应用会愈发广泛。

4 总结与展望

近年来, 酶法制备手性化合物已被证明是实现绿色生物制造的重要途径, 特别是氧化-还

表 5 FDH 在手性生物制造中的应用总结
Table 5 Summary of application of FDH in biomanufacturing of chiral chemicals

Chiral product	Biocatalyst	Enzyme for cofactor regeneration	FDH mutant	Catalytic efficiency of FDH (L/(mmol·s))	Half-life of FDH (h)	Space-time yield (g/(L·d))	Yield (%)	Conversion (%)	<i>e.e.</i> _p (%)	References
Ethyl-(<i>S</i>)-3-hydroxy-3-phenylpropanoate	Reductase	<i>Myc</i> FDH	D221G	1.7	<0.1	—	—	—	>99.0	[43,62]
			C145S/D221Q/ C255V	2.9	56.0	—	—	—	>99.0	[43,62]
L-2-aminobutyric acid	LeuDH	GDH	—	—	—	170.4	—	99.0	—	[63]
		GDH	—	—	—	199.7	>90.0	—	—	[64]
		<i>Fg</i> FDH	—	—	—	463.2	—	99.0	>99.5	[54]
		<i>Pse</i> FDH	A198G	121.7→208.6 ^a	—	165.6	>97.0	—	>99.5	[64]
L-phosphinothricin	GFDH	<i>Lb</i> FDH	—	29.3	—	—	89.0	99.0	>99.0	[55-56]
	LeuDH	GDH	—	—	—	945.0	80.0	99.0	>99.0	[65]
L-tert-leucine		<i>Cbo</i> FDH	—	—	—	786.0	—	99.0	>99.0	[53]
	D-AADH	<i>Bst</i> FDH	G146M/A287G	55.3→98.0	—	—	>91.0	>99.0	>99.0	[57]
D-phenylalanine	D-AA	—	—	—	—	—	—	91.1	86.7	[66]
	D-AADH	<i>Cbo</i> FDH	V120S/N187D	6.6→9.2	—	—	>90.0	—	>99.0	[58]
<i>(R,S)</i> -2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid	D-LDH	<i>Cbo</i> FDH	V120S/N187D	6.6→9.2	—	>257.0	—	>95.8	>99.0	[59]
	BDH	—	—	—	—	64.8	82.5	—	—	[67]
<i>(2S,3S)</i> -2,3-butanediol	GDH	—	—	—	—	67.2	85.4	—	—	[67]
	<i>Cbo</i> FDH	V120S/N187D	V120S/N187D	6.6→9.2	—	86.4	91.8	—	—	[60,67]
<i>(R)</i> -amines	AmDH	<i>Cbo</i> FDH	V120S/N187D	6.6→9.2	—	—	—	91.0	>99.0	[61]

^a Increased from 121.7 to 208.6 L/(mmol·s).

原生物合成体系得到了越来越广泛的应用,其反应过程往往涉及 NAD(P)H 等辅酶,成本高昂无法大规模生产,故构建高效的辅酶再生体系成为亟须解决的问题。其中,FDH 辅酶再生体系已成为辅酶再生领域的研究热点,针对 FDH 与其他辅酶再生体系的酶相比存在催化效率较低、稳定性较差、对辅因子和底物的亲和力较低等问题,酶学专家和生物化工工程师们通过定向进化、理性设计和半理性设计改造筛选催化效率高、稳定性强、辅酶偏好性强的 FDH。

本文总结了近些年通过酶分子改造的方法提高 FDH 的稳定性、优化动力学参数、改变辅酶偏好性的研究,虽然 FDH 的酶活有所提升,但是目前将其应用于工业上的实例还比较少。因此,后续的研究可侧重于以下两个方面:(1) 通过基因组挖掘、宏基因组筛选等方法筛选出新的酶活更高的野生型 NAD⁺或 NADP⁺依赖型 FDH,扩大 FDH 基因文库。(2) 在目前研究基础上,利用蛋白质工程对 FDH 继续改造,获得催化活性更高、稳定性更强的 FDH,筛选出具有工业属性的 FDH,使 FDH 辅酶再生体系更好地服务于绿色生物制造。

REFERENCES

- [1] Hummel W, Gröger H. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *J Biotechnol*, 2014, 191: 22-31.
- [2] 谭天伟, 陈必强, 张会丽, 等. 加快推进绿色生物制造 助力实现“碳中和”. *化工进展*, 2021, 40(3): 1137-1141.
Tan TW, Chen BQ, Zhang HL, et al. Accelerate promotion of green bio-manufacturing to help achieve “carbon neutrality”. *Chem Ind Eng Prog*, 2021, 40(3): 1137-1141 (in Chinese).
- [3] Fischer T, Pietruszka J. Key building blocks via enzyme-mediated synthesis. *Top Curr Chem*, 2010, 297: 1-43.
- [4] Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(6): 815-831.
- [5] Robescu MS, Rubini R, Beneventi E, et al. From the amelioration of a NADP⁺-dependent formate dehydrogenase to the discovery of a new enzyme: round trip from theory to practice. *Chem Cat Chem*, 2020, 12(9): 2478-2487.
- [6] Gao X, Ni KF, Zhao CC, et al. Enhancement of the activity of enzyme immobilized on polydopamine-coated iron oxide nanoparticles by rational orientation of formate dehydrogenase. *J Biotechnol*, 2014, 188: 36-41.
- [7] Van Der Donk WA, Zhao H. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(4): 421-426.
- [8] Wichmann R, Vasic-Racki D. Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 92: 225-260.
- [9] 程峰, 李清华, 李恒, 等. NAD(P)H 依赖型氧化还原酶不对称还原胺化制备手性胺的研究进展. *生物工程学报*, 2020, 36(9): 1794-1816.
Cheng F, Li QH, Li H, et al. NAD(P)H-dependent oxidoreductases for synthesis of chiral amines by asymmetric reductive amination of ketones. *Chin J Biotech*, 2020, 36(9): 1794-1816 (in Chinese).
- [10] 张晓健, 刘倩, 柳志强, 等. 立体选择性羰基还原酶及其在手性醇合成中的应用. *化工进展*, 2021, 40(3): 1142-1160.
Zhang XJ, Liu Q, Liu ZQ, et al. Stereoselective carbonyl reductases and their application in chiral alcohols synthesis. *Chem Ind Eng Prog*, 2021, 40(3): 1142-1160 (in Chinese).
- [11] 程峰, 相超, 王亚军. ω -转氨酶不对称合成手性胺及非天然氨基酸的研究进展. *生物加工过程*, 2018, 16(3): 1-11.
Cheng F, Xiang C, Wang YJ. ω -transaminase for asymmetric synthesis of chiral amines and unnatural amino acids. *Chin J Bioprocess Eng*, 2018, 16(3): 1-11 (in Chinese).
- [12] Kizaki N, Yasohara Y, Hasegawa J, et al. Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(5): 590-595.
- [13] Tishkov VI, Galkin AG, Fedorchuk VV, et al. Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺-

- and NADP⁺-specific formate dehydrogenases. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(2): 187-193.
- [14] Chen X, Zhang HL, Maria-Solano MA, et al. Efficient reductive desymmetrization of bulky 1, 3-cyclodiketones enabled by structure-guided directed evolution of a carbonyl reductase. *Nat Catal*, 2019, 2(10): 931-941.
- [15] Tishkov VI, Popov VO. Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol Eng*, 2006, 23(2/3): 89-110.
- [16] Özgün GP, Ordu EB, Tütüncü HE, et al. Site saturation mutagenesis applications on *Candida methylca* formate dehydrogenase. *Scientifica (Cairo)*, 2016, 2016: 4902450.
- [17] Tishkov VI, Popov VO. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry (Mosc)*, 2004, 69(11): 1252-1267.
- [18] Galkin A, Kulakova L, Tishkov V, et al. Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N₁₀. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 44(3/4): 479-483.
- [19] Chow CM, RajBhandary UL. Developmental regulation of the gene for formate dehydrogenase in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol*, 1993, 175(12): 3703-3709.
- [20] Allen SJ, Holbrook JJ. Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylca*. *Gene*, 1995, 162(1): 99-104.
- [21] Slusarczyk H, Felber S, Kula MR, et al. Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem*, 2000, 267(5): 1280-1289.
- [22] Yamamoto H, Mitsuhashi K, Kimoto N, et al. Robust NADH-regenerator: improved α -haloketone-resistant formate dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(1): 33-39.
- [23] Galkin AG, Kutsenko AS, Bajulina NP, et al. Site-directed mutagenesis of the essential arginine of the formate dehydrogenase active centre. *Biochim et Biophys Acta BBA-Protein Struct Mol Enzymol*, 2002, 1594(1): 136-149.
- [24] Carugo O, Argos P. NADP-dependent enzymes. II: evolution of the mono- and dinucleotide binding domains. *Proteins*, 1997, 28(1): 29-40.
- [25] Lamzin VS, Dauter Z, Popov VO, et al. High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *J Mol Biol*, 1994, 236(3): 759-785.
- [26] Calzadiaz-Ramirez L, Calvó-Tusell C, Stoffel GMM, et al. *In vivo* selection for formate dehydrogenases with high efficiency and specificity toward NADP. *ACS Catal*, 2020, 10(14): 7512-7525.
- [27] Jiang HW, Chen Q, Pan J, et al. Rational engineering of formate dehydrogenase substrate/cofactor affinity for better performance in NADPH regeneration. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 192(2): 530-543.
- [28] Fogal S, Beneventi E, Cendron L, et al. Structural basis for double cofactor specificity in a new formate dehydrogenase from the *Acidobacterium Granulicella mallensis* MP5ACTX8. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(22): 9541-9554.
- [29] Alpdağtaş S, Yücel S, Kapkaç HA, et al. Discovery of an acidic, thermostable and highly NADP⁺ dependent formate dehydrogenase from *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(7): 1135-1147.
- [30] Wu WH, Zhu DM, Hua L. Site-saturation mutagenesis of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* creating effective NADP⁺-dependent FDH enzymes. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, 61(3/4): 157-161.
- [31] Takacs M, Makhlynets OV, Tolbert PL, et al. Secretion of functional formate dehydrogenase in *Pichia pastoris*. *Protein Eng Des Sel*, 2017, 30(3): 279-284.
- [32] Peacock D, Boulter D. Kinetic studies of formate dehydrogenase. *Biochem J*, 1970, 120(4): 763-769.
- [33] Saleeba JA, Cobbett CS, Hynes MJ. Characterization of the amdA-regulated *aciA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 1992, 235(2/3): 349-358.
- [34] Dong G, Ryde U. Reaction mechanism of formate dehydrogenase studied by computational methods. *J Biol Inorg Chem*, 2018, 23(8): 1243-1254.
- [35] Yilmazer B, Isupov MN, de Rose SA, et al. Structural insights into the NAD⁺-dependent formate dehydrogenase mechanism revealed from the NADH complex and the formate NAD⁺ ternary complex of the *Chaetomium thermophilum* enzyme. *J Struct Biol*, 2020, 212(3): 107657.
- [36] Shi J, Jiang Y, Jiang Z, et al. Enzymatic conversion of carbon dioxide. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(17): 5981-6000.
- [37] Jiang W, Lin P, Yang R, et al. Identification of catalysis, substrate, and coenzyme binding sites and improvement catalytic efficiency of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(19): 8425-8437.
- [38] Alekseeva AA, Fedorchuk VV, Zarubina SA, et al. The

- role of ala198 in the stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases. *Acta Naturae*, 2015, 7(1): 60-69.
- [39] Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front Microbiol*, 2015, 6: 742.
- [40] Papagianni M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 50.
- [41] Hatrongjit R, Packdibamrung K. A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: screening, purification and characterization. *Enzym Microb Technol*, 2010, 46(7): 557-561.
- [42] Andreadeli A, Fletmetakis E, Axarli I, et al. Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(6): 976-984.
- [43] Hoelsch K, Sührer I, Heusel M, et al. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2473-2481.
- [44] Savin SS, Tishkov VI. Assessment of formate dehydrogenase stress stability *in vivo* using inactivation by hydrogen peroxide. *Acta Naturae*, 2010, 2(1): 97-102.
- [45] Tishkov VI, Galkin AG, Marchenko GN, et al. Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp. formate dehydrogenase mutants containing cys-255-Ser and cys-255-met replacements. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(2): 976-981.
- [46] 刘美霞, 李强子, 孟冬冬, 等. 烟酰胺类辅酶依赖型氧化还原酶的辅酶偏好性改造及其在合成生物学中的应用. *合成生物学*, 2020, 1(5): 570-582.
Liu MX, Li QZ, Meng DD, et al. Protein engineering of nicotinamide coenzyme-dependent oxidoreductases for coenzyme preference and its application in synthetic biology. *Synth Biol J*, 2020, 1(5): 570-582 (in Chinese).
- [47] Gul-Karaguler N, Sessions RB, Clarke AR, et al. A single mutation in the NAD-specific formate dehydrogenase from *Candida methylca* allows the enzyme to use NADP. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(4): 283-287.
- [48] Tishkov VI, Yasnyi IE, Sadykhov EG, et al. Study of thermal stability of mutant NADP⁺-dependent formate dehydrogenases from *Pseudomonas* sp. 101. *Doklady Biochem Biophys*, 2006, 409(1): 216-218.
- [49] Seelbach K, Riebel B, Hummel W, et al. A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37(9): 1377-1380.
- [50] Rissom S, Schwarz-Linek U, Vogel M, et al. Synthesis of chiral ϵ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron Asymmetry*, 1997, 8(15): 2523-2526.
- [51] Andreadeli A, Platis D, Tishkov V, et al. Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. *FEBS J*, 2008, 275(15): 3859-3869.
- [52] Bommarius AS, Schwarm M, Stingl K, et al. Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron Asymmetry*, 1995, 6(12): 2851-2888.
- [53] Liu WM, Ma HM, Luo JX, et al. Efficient synthesis of L-tert-leucine through reductive amination using leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase coexpressed in recombinant *E. coli*. *Biochem Eng J*, 2014, 91: 204-209.
- [54] 徐建妙, 陈策, 张博, 等. 亮氨酸脱氢酶与甲酸脱氢酶共表达菌株发酵产酶条件优化及其在 L-2-氨基丁酸合成中的应用. *食品与发酵工业*, 2019, 45(10): 29-35.
Xu JM, Chen C, Zhang B, et al. Optimized conditions for *Escherichia coli* (LeuDH/FDH) co-expressing leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase for producing L-2-aminobutyric acid. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(10): 29-35 (in Chinese).
- [55] Cao CH, Gong H, Dong Y, et al. Enzyme cascade for biocatalytic deracemization of D, L-phosphinothricin. *J Biotechnol*, 2021, 325: 372-379.
- [56] Cheng F, Li QH, Zhang HY, et al. Simultaneous directed evolution of coupled enzymes for efficient asymmetric synthesis of L-phosphinothricin. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 87(5): e02563-20.
- [57] Zhang DP, Jing XR, Zhang WL, et al. Highly selective synthesis of D-amino acids from readily available L-amino acids by a one-pot biocatalytic stereoinversion cascade. *RSC Adv*, 2019, 9(51): 29927-29935.
- [58] Chen X, Cui Y, Cheng X, et al. Highly atom economic synthesis of D-2-aminobutyric acid through an *in vitro* tri-enzymatic catalytic system. *Chemistry Open*, 2017, 6(4): 534-540.
- [59] Zhang C, Song W, Liu J, et al. Production of enantiopure (R)- or (S)-2-hydroxy-4-(methylthio)

- butanoic acid by multi-enzyme cascades. *Bioresour Bioprocess*, 2019, 6(1): 9.
- [60] He YZ, Chen FX, Sun MJ, et al. Efficient (3S)-acetoin and (2S,3S)-2,3-butanediol production from meso-2,3-butanediol using whole-cell biocatalysis. *Molecules*, 2018, 23(3): E691.
- [61] Knaus T, Böhmer W, Mutti FG. Amine dehydrogenases: efficient biocatalysts for the reductive amination of carbonyl compounds. *Green Chem*, 2017, 19(2): 453-463.
- [62] Sührer I, Haslbeck M, Castiglione K. Asymmetric synthesis of a fluoxetine precursor with an artificial fusion protein of a ketoreductase and a formate dehydrogenase. *Process Biochem*, 2014, 49(9): 1527-1532.
- [63] 张蔡喆, 杨套伟, 周俊平, 等. 大肠杆菌全细胞转化联产 L-2-氨基丁酸和 D-葡萄糖酸. *生物工程学报*, 2017, 33(12): 2028-2034.
Zhang CZ, Yang TW, Zhou JP, et al. Whole-cell biotransformation for simultaneous synthesis of L-2-aminobutyric acid and D-gluconic acid in recombinant *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2017, 33(12): 2028-2034 (in Chinese).
- [64] Tao RS, Jiang Y, Zhu FY, et al. A one-pot system for production of L-2-aminobutyric acid from L-threonine by L-threonine deaminase and a NADH-regeneration system based on L-leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4): 835-841.
- [65] Li J, Pan J, Zhang J, et al. Stereoselective synthesis of L-tert-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2014, 105: 11-17.
- [66] Sumida Y, Iwai S, Nishiya Y, et al. Identification and characterization of D-succinylase, and a proposed enzymatic method for D-amino acid synthesis. *Adv Synth Catal*, 2016, 358(13): 2041-2046.
- [67] Wang Y, Li LX, Ma CQ, et al. Engineering of cofactor regeneration enhances (2S,3S)-2,3-butanediol production from diacetyl. *Sci Rep*, 2013, 3: 2643.

(本文责编 郝丽芳)